N° d'ordre : 367

N° d'ordre du C.N.R.S.

AO - 7408

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

MAX LAURENT

CYCLE BIOLOGIQUE DE L'AZOTE AU SEIN DES ÉTANGS : ROLE DES FACTEURS ÉCOLOGIQUES

Soutenue le 5 Juillet 1972, devant la Commission d'Examen :

MM.	**J. SÉCHET,** Professeur.....	**Président.**
	J. POCHON, Chef du Service de Microbiologie du sol à l'Institut Pasteur, Membre correspondant de l'Institut	**Examinateurs.**
	R. VIBERT, Directeur de la Station d'Hydrobiologie Continentale de l'I.N.R.A. à Biarritz.....	
	J. EYMÉ, Professeur	
	J. VINDT, Professeur, Directeur de l'Unité de Biologie.....	

— 1972 —

N° d'ordre : 367

N° d'ordre du C.N.R.S.
AO - 7408

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

MAX LAURENT

CYCLE BIOLOGIQUE DE L'AZOTE AU SEIN DES ÉTANGS : ROLE DES FACTEURS ÉCOLOGIQUES

Soutenue le 5 Juillet 1972, devant la Commission d'Examen :

MM.	**J. SÉCHET,** Professeur.....	**Président.**
	J. POCHON, Chef du Service de Microbiologie du sol à l'Institut Pasteur, Membre correspondant de l'Institut	**Examinateurs.**
	R. VIBERT, Directeur de la Station d'Hydrobiologie Continentale de l'I.N.R.A. à Biarritz.....	
	J. EYMÉ, Professeur	
	J. VINDT, Professeur, Directeur de l'Unité de Biologie.....	

— 1972 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026
https://archive.org/details/IA41547317_0017

AVANT-PROPOS

Avant d'aborder l'exposé de ce travail, je voudrais remercier tous ceux qui m'ont apporté leur aide.

M. VIVIER, Directeur de Recherches honoraire à l'Institut National de la Recherche Agronomique, a consacré la plus grande partie de sa vie à la Limnologie. En 1963, il a bien voulu m'accueillir dans son service et me faire partager son enthousiasme pour l'étude du milieu aquatique. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma gratitude. J'associerai à ces remerciements, M. WURTZ, Directeur de la Station du Paraclet, dont la disparition prématurée m'a empêché de bénéficier de ses grandes connaissances.

Je dois une particulière reconnaissance à M. le Professeur POCHON, Membre Correspondant de l'Institut, qui m'a inspiré le sujet de ce travail et auprès de qui j'ai toujours trouvé l'aide matérielle et morale nécessaire. Ses précieux conseils et encouragements ne m'ont jamais fait défaut tout au long de la réalisation de ce travail. En acceptant de le juger, il m'apporte la preuve de sa bienveillante sollicitude.

Mes remerciements très vifs vont également à M. le Professeur SECHET, qui a bien voulu d'emblée s'intéresser à mes recherches et qui a accepté la lourde tâche de présider le Jury.

Je remercie M. VIBERT, Directeur de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique, qui m'a permis de terminer mon travail à la Station d'Hydrobiologie de Biarritz et qui a accepté de faire partie du Jury de cette thèse.

Que M. le Professeur EYME et M. le Professeur VINDT, Directeur de l'Unité de Biologie, qui ont bien voulu s'intéresser à mon travail et le juger, trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.

M. KAISER, Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur, a droit à toute ma reconnaissance pour m'avoir initié aux méthodes de travail en Microbiologie du sol et ensuite, pour m'avoir aidé, par ses grandes connaissances théoriques et par sa pratique du laboratoire, à surmonter toutes les difficultés rencontrées au cours de cette étude. J'ajoute que ses encouragements ne m'ont jamais fait défaut.

Mes remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes qui m'ont accueilli dans leurs laboratoires et qui m'ont aidé sans réserve pour la réalisation de mon travail :

M. CHAIGNEAU, Maître de Recherches au C.N.R.S., Chef du Laboratoire d'Analyse des gaz, ne m'a pas ménagé son temps et ses conseils pour les analyses de gaz.

M. FEUILLADE, Chargé de Recherches à l'I.N.R.A., m'a beaucoup apporté et en particulier en Chimie des eaux et des vases.

M. BADIA, Chargé de Recherches à la Station de Biométrie de l'I.N.R.A. avec qui a pu s'instaurer une collaboration efficace pour la réalisation de l'analyse mathématique.

Je ne saurais oublier ici les membres des différents laboratoires où le travail a été mené, et en particulier M. FEUTRIE, actuellement chimiste à la Station d'Hydrobiologie Lacustre de Thonon.

Je remercie enfin les membres du personnel de la Station de Biarritz qui m'ont aidé dans la réalisation de cette thèse.

INTRODUCTION

Parmi les milieux naturels, les écosystèmes aquatiques continentaux sont étudiés depuis longtemps. Les chercheurs se sont d'abord attachés aux questions les plus immédiatement intéressantes pour l'homme, c'est-à-dire l'étude des poissons en général. Parallèlement, on étudiait l'eau, milieu où vit le poisson.

Le rôle important des fonds des lacs, étangs et rivières a été également soupçonné depuis longtemps (THIENEMANN, 1926). Cependant, les difficultés d'étude de ces biotopes, dues aux faits qu'ils sont en permanence submergés, font qu'ils sont encore peu connus et que de nombreuses questions à leur sujet sont encore sans réponse. En particulier, si on considère le niveau des connaissances que l'on possède sur les sols émergés, sols de culture ou sols forestiers, par rapport aux sols submergés (vases de lacs, étangs, rivières), on est frappé par la disproportion existant entre les deux. Ce fait est logique, car il est bien évident que, pour l'homme, l'agriculture revêt une importance beaucoup plus grande que la pêche qui participe de l'économie de cueillette, ou même que la pisciculture qui est restée longtemps un élevage de type extensif.

Actuellement, les questions d'envasement des lacs, étangs et rivières prennent une importance croissante avec le développement des loisirs et l'aménagement piscicole, aussi bien pour la pisciculture que pour la pêche sportive. Il est évident qu'un aménagement piscicole rationnel passe par les connaissances des phénomènes biologiques fondamentaux qui ont lieu dans les écosystèmes aquatiques, à la fois dans la vase et dans l'eau.

Ce travail a pour but de contribuer à élucider des mécanismes biologiques mal connus, dans le milieu particulier qu'est l'étang ; en effet, devant la complexité des questions à aborder, l'étude s'est limitée aux eaux stagnantes.

KUZNETZOV (1959) a souligné l'importance de la microflore bactérienne dans le cycle de la matière organique et des éléments minéraux dans les étangs. WURTZ (1962) a défini la vase comme une usine biologique et a montré qu'elle joue le rôle de réservoir pour les éléments nutritifs nécessaires à la microflore aquatique, planctonique et benthique.

Il a donc semblé intéressant de se rendre compte du rôle exact des bactéries dans la minéralisation de la matière organique et d'étudier les échanges entre la vase et l'eau.

Parmi les éléments les plus importants dans la nature en général, et en particulier dans le cas qui nous préoccupe, c'est-à-dire des collections d'eau, l'azote vient à l'une des premières places ; en effet, l'importance de l'azote comme élément biogène n'est plus à démontrer : la production dépend de la quantité d'azote présent et des composés où ce corps se trouve engagé ; étant un constituant essentiel des protéines, l'azote est indispensable à la formation de la matière vivante dans toute la chaîne alimentaire, qui va de la bactérie à l'homme.

Toutes ces raisons nous ont conduit à étudier le cycle de l'azote dans les étangs. Dans les différents changements d'état de l'azote, il est évident que les bactéries jouent un rôle très important : en effet, les bactéries serviront à décomposer la matière organique azotée et, comme nourriture des invertébrés aquatiques, constitueront le premier stade de la nutrition azotée. Jusqu'à présent, les bactéries du cycle de l'azote ont été, en France, surtout étudiées dans les sols, VANSCHREVEN (1965).

L'exposé des travaux est divisé ainsi :

Nous avons présenté d'abord une courte mise au point des connaissances actuelles sur le cycle de l'azote dans les écosystèmes aquatiques.

Ensuite, nous avons regroupé la description des biotopes étudiés et des techniques utilisées, tant au point de vue du prélèvement des échantillons de vase et d'eau qu'au point de vue physique, chimique et microbiologique, ainsi que les dispositifs expérimentaux et les modes opératoires.

L'exposé des recherches comporte deux parties :

- La première présente les résultats d'une étude générale de divers biotopes suivie d'une étude écologique plus particulièrement consacrée au cycle de l'azote dans deux étangs ; pour faciliter l'interprétation de cette dernière, on a utilisé l'analyse mathématique ;
- La deuxième partie, elle-même divisée en quatre chapitres, présente les résultats des travaux expérimentaux : dénitrification et réorganisation de l'azote nitrique, nitrification autotrophe et hétérotrophe, production d'azote ammoniacal à partir de matière organique, production d'azote gazeux à partir de matière organique ;
- La dernière partie est constituée par les conclusions générales que l'on peut tirer des recherches exposées.

ETAT ACTUEL DU PROBLEME

Nos connaissances sur les sols aquatiques, surtout d'eau douce, sont encore bien loin de celle concernant les sols terrestres. La classification de ces sédiments est très négligée. Cependant, WURTZ (1956) a classé les vases d'eaux chimiquement polluées d'après leurs caractères physico-chimiques et, surtout, microbiologiques. L'évaluation des groupements fonctionnels microbiens a, par contre, attiré l'attention de chercheurs plus nombreux et, en particulier, des hydrobiologistes européens.

KUZNETZOV (1959) a étudié de façon complète le rôle des microorganismes dans le cycle des éléments dans les eaux et les lacs.

RUTTNER (1953) a également souligné l'importance de la microflore bactérienne dans l'évolution des sédiments lacustres.

RODINA (1959) analyse les microorganismes de la couche superficielle des vases d'étangs en portant son attention sur les fixateurs de l'azote.

GAMBARIAN (1958) relate la présence d'Azotobacter et de Clostridium fixateurs d'azote dans le lac Sévan.

L' activité des bactéries sulfatoréductrices a été prouvée dans les sédiments d'eau douce les plus divers : IVANOV et TEREBLOKA (1959), LIALIKOVA (1955), FROLOVA (1959), NOVOJILOVA (1959), CORBERI et SOLAINI (1960) mettaient en évidence l'existence de tous les groupes fonctionnels

dans l'eau et la vase du lac Majeur. MAKHTIEVA (1963), lors d'un travail similaire,fait ressortir l'action simultanée de sulfatoréducteurs et nitrifiants dans la vase du lac Bol'shoi. Citons, enfin, COOPER (1953) qui démontre une activation de la microflore totale au cours de l'été, quelles que soient la profondeur et la nature des sédiments.

Or, les vases, si elles sont des sols submergés, présentent avec les sols normaux des différences très grandes. En effet, il s'agit d'un milieu saturé d'eau dans ses couches supérieures (la vase superficielle contient jusqu'à 400 % d'eau) et surmonté d'un milieu ne contenant que peu d'oxygène (en moyenne 10 p.p.m) alors que l'air qui surmonte le sol en contient une proportion beaucoup plus grande (230.000 p.p.m). Ces conditions particulières entraînent de grandes différences dans la microbiologie et la chimie des deux biotopes, en particulier sur le cycle de l'azote ; des groupes fonctionnels de microorganismes, inactifs ou actifs dans le sol, existent dans la vase et réciproquement ; d'autre part, le potentiel d'oxydo-réduction très bas dans les milieux aquatiques favorise les réactions de réduction aux dépens des oxydations qui ne pourront se faire que de façon difficile.

Examinons les problèmes qui se posent au sujet du cycle de l'azote dans les milieux aquatiques.

Dans les collections d'eau, l'azote se présente d'une manière générale sous trois formes :

1 - L'azote moléculaire

Il provient de l'air dissous dans l'eau, de la décomposition de la matière organique et de la réduction des nitrates. La quantité d'azote dissous dans l'eau dépend, comme l'oxygène, de la température.

Voici, à titre indicatif, les quantités d'azote dissous à diverses

profondeurs dans un lac américain (d'après HUTCHINSON (1957) :

Profondeur en m.	N_2 en mg/l	Température	% saturation
3	9,8	19,5	94
3,5	13,2	19,2	126
6	14,1	9,5	111
10	13,8	8,5	104

Comme on le voit dans ce tableau, si la sursaturation est possible, les quantités d'azote dissoutes dans l'eau sont du même ordre de grandeur que celles de l'oxygène.

2 - L'azote combiné sous forme minérale

Il provient d'une part de l'apport en sels minéraux, nitriques et ammoniacaux apportés par les eaux de ruissellement et d'autre part, de la décomposition de la matière organique azotée.

3 - L'azote organique

Il se présente sous deux formes, d'une part dans la matière vivante, végétale et animale, et d'autre part dans la matière organique constituée par les cadavres et les produits d'excrétion des organismes vivants ; il peut également provenir de la fixation biologique de l'azote moléculaire.

Considérons le schéma du cycle de l'azote dans le cas d'un étang de faible profondeur, c'est-à-dire, d'un étang où la température de l'eau et la teneur en oxygène sont considérées comme n'ayant qu'un faible gradient dans la masse d'eau.

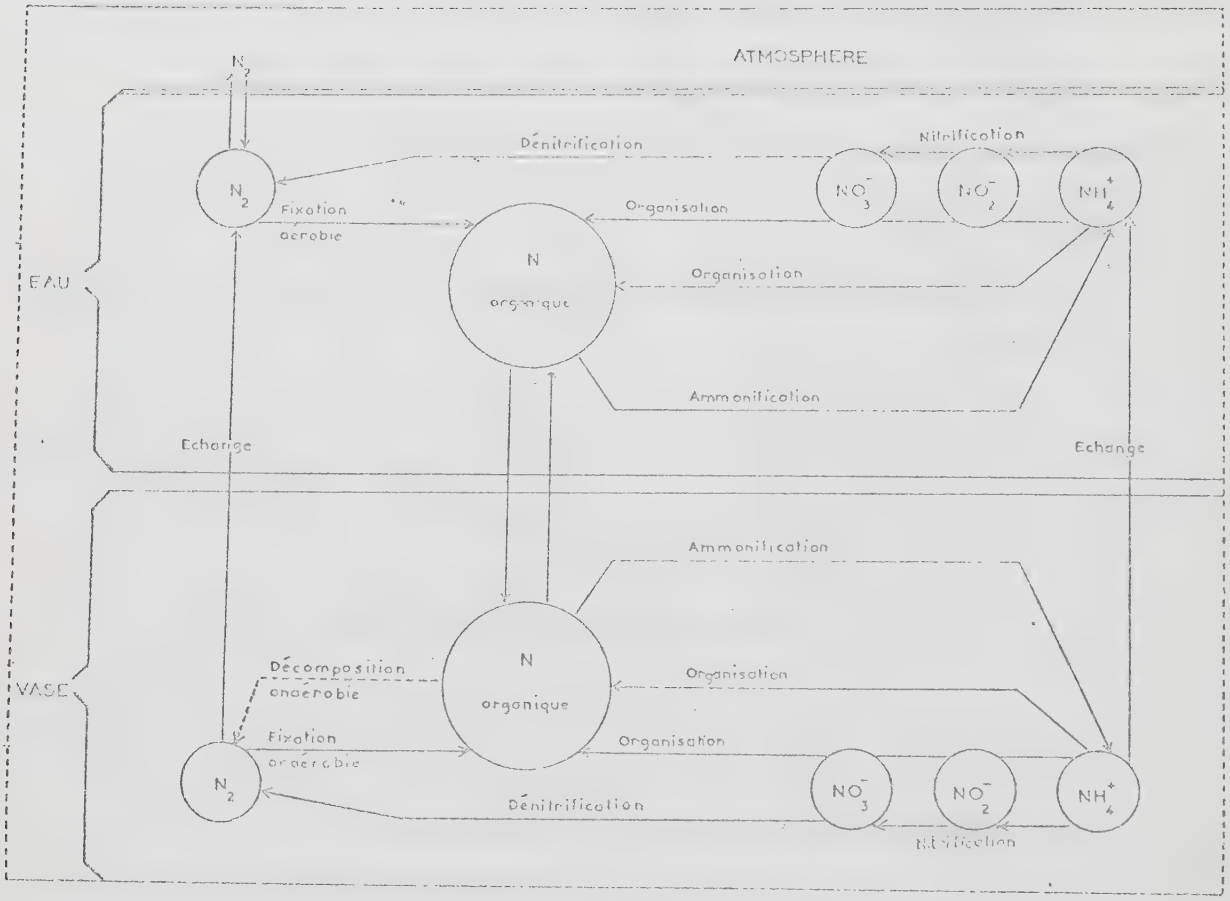


Fig. 1 - Schéma du cycle de l'azote dans les étangs.

L'examen de ce cycle nous montre immédiatement qu'en fait, il s'agit dans les sols submergés de deux cycles superposés avec des échanges à certains niveaux.

DENITRIFICATION ET REORGANISATION DE L'AZOTE NITRIQUE

La dénitrification au sens large est la transformation de nitrates en composés où l'azote a un nombre d'oxydation plus faible.

Ainsi l'assimilation des nitrates par les microorganismes constitue une dénitrification, de même l'utilisation de l'oxygène des nitrates par certains microorganismes pour l'oxydation de substances organiques ou minérales.

Au point de vue théorique, on admet qu'il existe deux chaînes de réactions dans la réduction des nitrates :

- l'une directe aboutissant à la forme la plus réduite, l'ammoniac ;
- l'autre indirecte donnant l'azote moléculaire.

Ces chaînes peuvent être résumées ainsi :

Production d'azote ammoniacal

NO_3^-	$\longrightarrow$	NO_2^-	$\longrightarrow$	$N_2O_2^{--}$	$\longrightarrow$	NH_2^+	$\longrightarrow$	NH_4^+
Nitrate		Acide nitreux		Acide Hyponitreux		Hydroxy-lamine		Azote ammoniacal
+ 5		+ 3		+ 1		- 1		- 3

Production d'azote moléculaire

NO_3^-	$\longrightarrow$	NO_2^-	$\longrightarrow$	$N_2O_2^{--}$	$\longrightarrow$	N_2O	$\longrightarrow$	N_2
Nitrate		Acide nitreux		Acide Hyponitreux		Oxyde nitreux		Azote moléculaire
+ 5		+ 3		+ 1		+ 1		0

D'autre part, le N_2 formé peut provenir d'autres réactions qui, d'après MICHOUSTINE (1964), se produisent dans le sol :

- Réaction de Van Slike :

$$R - NH_2 + NO_2H \longrightarrow N_2 + R - OH + H_2O$$

- Réaction des sels d'ammonium avec les nitrites :

$$NH_4^+ + NO_2^- \longrightarrow N_2 + 2\,H_2O$$

Ces réactions nécessitant des nitrites pour se former peuvent être considérées comme résultant de la première étape de la dénitrification.

Nous n'admettrons comme dénitrifiants au sens strict que les microorganismes produisant l'azote moléculaire à partir des nitrates.

La classification ancienne de WAKSMAN ne présentait comme dénitrifiants vrais qu'un petit nombre d'espèces : des travaux récents de WOLDENDORP (1963-1965) ont montré qu'en fait, l'ammoniac libéré après adjonction de nitrates provenait en grande partie de la matière organique présente auparavant dans le sol.

RODINA (1956) avait constaté une augmentation du nombre de dénitrifiants, après adjonction de nitrates dans l'eau d'un étang.

Sur la question de l'importance des pertes en azote par dénitrification, les avis restent partagés :

Certains (PICHINOTY, 1965) s'appuient sur le fait que l'oxygène inhibe à la fois la formation des enzymes nécessaires aux différentes étapes de la dénitrification et la fonction de ces enzymes, et pensent que dans les sols agricoles toujours relativement aérés, ces pertes doivent être très faibles. Dans le cas des sols submergés, qui font l'objet de cette étude, la dénitrification peut être plus importante que dans les sols,du fait de la

faible teneur en oxygène de ces milieux.

D'autres (MICHOUSTINE et al., 1965) s'appuient sur des essais de laboratoire dans des récipients contenant des plantes, pensent que les pertes en azote après adjonction de nitrates sont très importantes (jusqu'à 50 %) dans les sols.

Dans les sols submergés, les auteurs s'accordent donc pour penser que les pertes en azote gazeux sont importantes (dans le cas où l'azote n'est pas dissous dans l'eau et repris de nouveau par les organismes fixateurs d'azote).

LA NITRIFICATION

Elle est au sens propre la production de nitrates et peut s'effectuer de deux façons par voie biologique : il existe une nitrification autotrophe, très connue dans les sols, et une nitrification hétérotrophe dont les modalités sont beaucoups moins connues. La nitrification autotrophe exige des conditions aérobies pour se produire alors que la nitrification hétérotrophe peut avoir lieu dans des conditions d'aérobiose facultative. Rappelons la théorie de ces deux sortes de nitrification :

a) Nitrification autotrophe

Elle se fait en deux étapes, avec intervention successive de germes du type Nitrosomonas et Nitrobacter essentiellement.

Au point de vue des différentes étapes de son oxydation, la nitrification autotrophe se présente ainsi :

Azote Ammoniacal — Hydroxylamine — Polymère du radical nitrosyle (forme non précisée) — Azote nitreux — Azote nitrique

Nitrosomonas — Nitrobacter

Les caractéristiques de cette nitrification qui se produit toujours dans les sols normaux, sont les suivantes :

- l'énergie nécessaire aux synthèses biologiques provient de l'oxydation de l'azote ammoniacal par l'oxygène ;

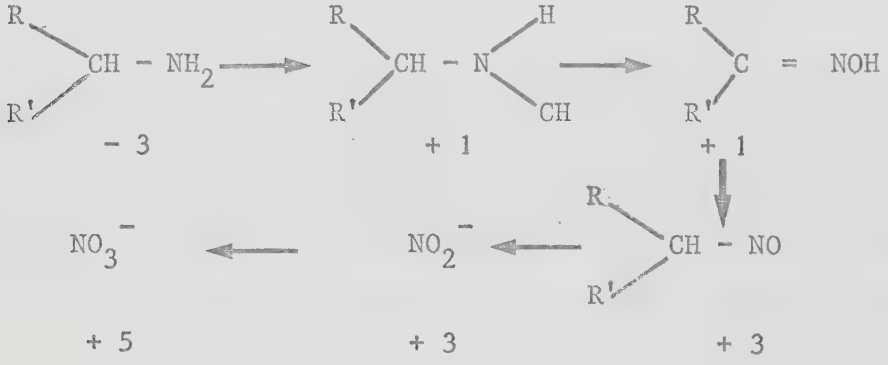
- la seule source de carbone nécessaire est le gaz carbonique issu des carbonates ;

- la matière organique n'est pas attaquée ;

- le nombre des germes dans le sol est faible.

b) Nitrification hétérotrophe

Considérons le schéma des étapes de la nitrification hétérotrophe :



Les caractéristiques de cette nitrification sont les suivantes (OBATON, 1966) :

- les réactions ne produisent pas d'énergie pendant la multiplication des cellules, elles ne servent pas aux synthèses biologiques ; la nitrification a donc lieu après la croissance ;

- la présence de matière organique dans le milieu est nécessaire, ce qui indique l'hétérotrophie. De nombreux corps sont attaqués, en particulier l'asparagine ;

- les germes hétérotrophes sont très nombreux dans les sels où la nitrification hétérotrophe a été étudiée surtout chez les champignons (ALEXANDER, MARSHALL et HIRSCH, 1960) ; cependant, certaines bactéries sont capables de nitrifier la matière organique, il s'agit principalement des Arthrobacter dont certaines souches ont été isolées de vase de canaux (MULDER et ANTHEUNISSE, 1963).

Les conditions particulières du milieu aquatique nous amènent dès l'abord à penser que la nitrification hétérotrophe y aura une plus grande importance que la nitrification autotrophe. En effet, il est nécessaire de souligner ici les faits suivants : alors que la nitrification autotrophe ne s'effectue que dans des conditions aérobies strictes, la nitrification hétérotrophe peut s'effectuer dans des conditions d'anaérobiose relative, à des potentiels redox analogues à ceux existant dans les vases d'étangs de faible profondeur ou dans les lacs eutrophes pendant la période de circulation.

Même si on admet, comme certains (RODINA, 1964 ; KUZNETZOV, 1959), l'existence à la surface de la vase de microzones oxydées, il semble bien que les nitrificateurs autotrophes sont dans des conditions défavorables et que les nitrates, toujours présents dans les vases, ont pour origine une nitrification hétérotrophe, comme cela a été envisagé par KALINENKO (1948).

GUNNER (1963) a pu montrer que Arthrobacter globiformis, souche 613, était capable de nitrifier l'azote ammoniacal jusqu'au stade nitrate. Et d'autre part, comme nous l'avons dit plus haut, MULDER et ANTHEUNISSE ont mis en évidence des Arthrobacter en grand nombre, en particulier dans des vases d'égout.

La décomposition de la matière organique dans les milieux aquatiques et, en particulier, dans les vases, est un phénomène très important : en effet, la présence ou l'absence de vase se trouvent sous la dépendance de la vitesse et de l'importance de la minéralisation des matières organiques.

L'ammonification est un processus complexe car l'ammoniac peut provenir de la désamination de nombreuses substances allant des polypeptides aux sucres aminés. Cependant, le produit final de la décomposition reste toujours l'ammoniac sous forme libre (NH_3) ou, plus souvent (NH_4^+) en milieu aquatique ; il est évident que la présence de NH_3 libre est très rare : dès qu'il est libéré par la vase, il se trouve aussitôt dissous et ionisé à l'intérieur du sédiment lui-même ou dans l'eau susjacente.

Les réactions chimiques, produites plus souvent par des enzymes bactériennes, et conduisant à la libération d'azote ammoniacal peuvent être résumées ainsi :

Des enzymes exocellulaires provoquent d'abord la scission de grosses molécules complexes en petites molécules plus simples pouvant pénétrer dans les corps cellulaires où agissent des endoenzymes.

Les acides aminés sont ensuite dégradés, les réactions de dégradation sont classiques.

Les différentes étapes de l'ammonification et de la dynamique de cette fonction ont été beaucoup étudiées dans les sols.

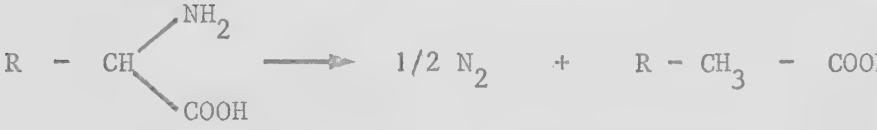
De nombreux auteurs ont étudié le dégagement d'azote ammoniacal en fonction des caractéristiques de diverses substances ajoutées au sol. POCHON et TCHAN (1947 a) ont montré, en ajoutant de la poudre de sang à une terre de jardin, que le dégagement d'ammoniac est un phénomène progressif dans le temps. POCHON et al. (1947 b), JANSSON (1958), SIMON (1960), DOMMERGUES (1962), BROADBENT (1966) sont d'accord pour admettre qu'en présence d'humus ou de matière organique, la libération d'azote ammoniacal est une fonction inverse du rapport C/N.

Lorsqu'on mesure la quantité d'azote ammoniacal après la décomposition de la matière organique, on ne dose que partiellement l'azote effectivement libéré : une partie est réutilisée rapidement par les

microorganismes, algues et bactéries et une autre est fixée à l'intérieur des argiles.

Dans les sédiments aquatiques, après les premiers travaux de OMELIANSKI (1906) sur la formation du méthane dans les vases naturelles par décomposition de la matière organique, on peut citer KUZNETZOV (1949) qui a étudié l'ammonification de la matière organique et les travaux récents de KUZNETZOV (1968) sur la production et la destruction de la matière organique dans les lacs ainsi que ceux de RODINA (1966) qui a montré que la décomposition et la synthèse de la matière organique dans la vase dépendent de la constitution des agrégats bactériens à la surface des détritus.

La transformation de l'azote organique en azote moléculaire peut se traduire schématiquement, au point de vue chimique, en partant d'un acide aminé de la façon suivante :



Au point de vue des nombres d'oxydation, cette réaction, qui fait passer l'azote du niveau -3 au niveau 0, est une oxydation.

La formation d'azote moléculaire par décomposition anaérobie de la matière organique, qui est une oxydation au sens large, n'a jamais été démontrée avec certitude dans un milieu naturel. KUZNETZOV et CHARTULARI (1941) ont examiné les gaz dégagés par la vase ; ils ont trouvé dans les gaz dégagés un gaz inerte qu'ils ont appelé azote, et ont remarqué que les proportions des divers gaz variaient avec le temps d'incubation et que le gaz qu'ils supposaient être de l'azote n'apparaît qu'après 8 à 10 jours d'incubation de la vase; plus tard, FREVOT (1946) a montré qu'un Clostridium isolé de boues méthanogènes naturelles produisant de l'azote en culture pure, à partir d'un milieu contenant de la matière organique et ne contenant pas de nitrates ; enfin, CHAIGNEAU et al. (1965)ont mis en évidence la production d'azote, en milieu non glucosé, par Clostridium septicum.

KUZNETZOV (1959) dans son schéma du cycle de l'azote, repris par BROOK (1966), indique cette source de production d'azote par décomposition anaérobie comme probable.

Pour aborder les problèmes posés par le cycle de l'azote dans les écosystèmes aquatiques, il nous a paru nécessaire d'effectuer une prospection des différents types d'eau : lacs, rivières, étangs.

Le travail a consisté d'abord à effectuer des analyses microbiologiques dans un certain nombre de vases, en dénombrant les groupes physiologiques bactériens par la technique classique des suspensions-dilutions en milieu liquide. A la suite de cette approche de la question, nous nous sommes attachés à l'étude particulière du cycle de l'azote qui semblait poser les problèmes les plus intéressants.

Nous avons alors étudié deux étangs situés dans des conditions géographiques différentes ; ces deux étangs ont fait l'objet de mesures chimiques et de dénombrements de germes pendant un cycle annuel. L'interprétation des résultats a été réalisée à l'aide de l'analyse mathématique, par des méthodes nouvelles, dont nous avons exposé le principe et qui semblent bien adaptées à ce type de problème.

Au vu de la littérature et de nos premiers travaux se sont dégagés un certain nombre de points qu'il nous a semblé nécessaire d'approfondir au laboratoire, en travaillant sur les vases, mais également sur l'eau, car les échanges entre les deux milieux sont constants.

Le devenir de l'azote nitrique introduit dans l'eau a été suivi en effectuant des dosages chimiques dans l'eau et la vase issues d'un étang et en dressant des courbes d'activité de la microflore dénitrifiante.

L'ammonification de la matière organique dans la vase nous a semblé également une fonction très importante, car elle conditionne la production de l'azote ammoniacal. Dans le but de nous rendre compte si les processus d'ammonification suivent les mêmes lois que dans les sols, nous

avons étudié la décomposition de poudre de luzerne d'une part, comme type de matière organique à rapport C/N bas et de poudre de feuilles de chêne comme type de matière organique à rapport C/N élevé.

Les problèmes de nitrification dans la vase sont liés aux questions de potentiel d'oxydoréduction et d'hétérotrophie. Pour préciser les modalités de cette nitrification, nous avons étudié sur des modèles écologiques simples, la nitrification dans des conditions d'oxydoréduction analogues à celles régnant dans les vases. Nous avons également isolé des germes du type Arthrobacter et étudié leur propriétés nitrifiantes.

Parmi les gaz dégagés par les vases, il nous a semblé indispensable de nous rendre compte si l'azote occupait une place importante, c'est-à-dire si les conclusions tirées des résultats trouvés en culture pure pouvaient s'appliquer aux mélanges complexes de germes que sont les vases.

Nous avons utilisé la spectrographie de masse qui a permis une analyse très fine des mélanges gazeux et des acides aminés marqués à l'azote lourd qui nous ont permis d'apprécier la provenance de l'azote trouvé dans les mélanges gazeux.

MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre regroupe la description des échantillons de vase et d'eau utilisés, ainsi que l'exposé des travaux sur le terrain et des expériences de laboratoire ; il présente également les méthodes d'analyses utilisées pour la détermination des caractéristiques physiques et chimiques, ainsi que la constitution des milieux et les conditions d'ensemencement et de dénombrement de germes dans les études microbiologiques.

A - LES DIFFERENTS BIOTOPES ETUDIES

- Etang de la Rouillie (Oise)

Etang de dimensions moyennes (60 ha environ) situé en forêt de Compiègne, loin de toute agglomération . Sa profondeur moyenne est voisine de 1,50 m. Il est situé au milieu d'une forêt de chênes, sur un sol calcaire d'alluvions quaternaires. Il peut être considéré comme très peu pollué. Le fond est recouvert d'une vase noirâtre sur l'ensemble de sa surface ; la vase et l'eau de cet étang, choisi en raison à la fois de son isolement et de la proximité du laboratoire, ont été utilisées comme matériaux de base dans la plupart des recherches exposées ; l'étang a également fait l'objet d'une étude écologique pendant un cycle annuel.

- Etang de Soustons (Landes)

De grandes dimensions (400 ha), situé en bordure de l'Océan Atlantique, cet étang, comme tous les étangs landais, a été isolé de la mer par une barrière de sable, à la fin de l'ère tertiaire. Le sol, aux alentours de l'étang, est acide, et la végétation constituée d'aulnes (Alnus glutinosa) puis de pins (Pinus maritima) en s'écartant du rivage ; le fond est recouvert d'une vase noire sur une partie importante de sa surface. Mais on ne peut préciser le pourcentage de la surface vase-sable. La vase en certains

points atteint une épaisseur de plus d'un mètre. Cet étang, choisi pour sa proximité de la Station d'Hydrobiologie de Biarritz, a également fait l'objet d'une étude écologique, en comparaison avec le précédent.

- Autres biotopes étudiés

1) Lac de Nantua

Lac du Jura de nature très eutrophe, l'eau est périodiquement et massivement envahie par une oscillaire rouge. Vase de structure très fine, homogène, noirâtre, collante, à odeur légèrement fétide, rapidement oxydée à l'air (devient jaune-ôcre), prélevée à la partie supérieure du sédiment sous 38 mètres d'eau.

2) Lac d'Annecy (Haute-Savoie)

Lac des Alpes, encore relativement oligotrophe. Vase de structure, fine, homogène, de couleur grisâtre, sans odeur fétide, prélevée à la surface du sédiment sous 7 mètres d'eau.

3) Lac du Mont-Cenis (Haute-Savoie)

Lac des Alpes, situé au sommet du col du Mont-Cenis. Ce lac est dystrophe, c'est-à-dire que la couche d'eau proche du fond n'est pratiquement jamais renouvelée. La vase est noire, homogène, à odeur fétide, prélevée à la surface du sédiment sous 8 mètres d'eau

4) Lac du Barrage d'Eguzon (Indre)

Ce barrage est mis en eau depuis 1926. Sa superficie maxima est de 310 ha. La vase est riche en débris végétaux et compacte ; elle est noire, à odeur légèrement fétide, prélevée à la surface du sédiment sous 34 mètres d'eau.

5) La Noye (Somme)

Rivière à courant assez rapide, peu profonde, d'environ 3 à 4 mètres de large, végétation aquatique normale (densité et qualité), eau claire, fond vaseux brun, bordée de peupliers. Vase brun gris homogène, collante, contenant quelques débris végétaux, prélevée sous 70 cm d'eau au bord de la rivière, à la partie supérieure du sédiment (0-20 cm de profondeur).

6) La Somme

Bras de la Somme servant de collecteur d'affluents urbains et industriels de la ville d'Amiens ; largeur 1 à 2 m, profondeur environ 1 m, courant lent à moyen. L'eau est noirâtre, opaque, contenant en suspension des débris organiques de toute nature. Bordures d'aulnes buissonnants et de quelques roseaux. C'est une vase noirâtre, putride, avec des débris végétaux nombreux, structure fine, sableuse et argileuse, peu de gaz. Prélevée en bordure sous 50 cm d'eau à la partie supérieure du sédiment (0-20 cm).

7) La Poix (Somme)

Petite rivière de 1 à 2 m de large, à courant lent, peu profonde, bordée par de nombreux arbres et arbustes, eau claire ou légèrement trouble ; on remarque de nombreuses touffes de Sphaerotilus sur le fond. La rivière à cet endroit est fortement "polluée" par les déversements d'eaux résiduelles d'une laiterie située à 2 km, en amont du point de prélèvement. Vase brun noir, légère, putride, boursouflée par les bulles de gaz contenant de nombreuses larves de Chironomes, prélevée sous 15 cm d'eau à la partie supérieure du sédiment.

8) l'Aronde (Oise)

Petite rivière de 5 m de large, peu profonde, à courant rapide, eau claire, végétation aquatique abondante. Vase noire, homogène, consistante, à faible odeur putride.

9) Etang du Paraclet (Somme)

Petit étang peu profond, bordé de roseaux et de peupliers. Vase brun foncé, contenant de nombreux débris végétaux (radicelles, feuilles...) collante, prélevée au bord de l'étang sous 20 cm d'eau, à la partie supérieure du sédiment (0-20 cm de profondeur).

10) Etang nommé "Le Miroir"

Il est situé au Paraclet (Somme). Ses caractéristiques sont voisines de celles de l'étang précédent.

11) Etang de la Pature (Cher)

Etang situé en Sologne, dans le commune de Brinon-sur-Saulde. De petite dimension (4 ha); la vase est noire, putride et fluide. L'étang est entouré de roseaux (Typha et Phragmites).

12) Etang Palis (Loire-et-Loire)

Etang de petite dimension (1 ha) dans la forêt d'Amboise. La vase est jaune ôcre, à odeur moyenne, compacte. L'étang est entouré de chênes et saules.

13) Afin de pouvoir établir une comparaison avec un sol, on a également étudié une terre de jardin. Terre de plate-bande légère, caillouteuse, gris brun ; plantations diverses, fumure organique régulière.

B - PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS

1) Sédiment

Le problème des prélèvements de sédiments a surtout été abordé par les géologues et sédimentologues ; il existe de nombreux types de carottier, permettant de prélever des carottes de longueur variable allant jusqu'à plusieurs mètres ; ces carottiers sont décrits dans les traités classiques de sédimentologie.

Pour le microbiologiste, ce type d'appareillage présente un certain nombre d'inconvénients ; les couches superficielles de la vase qui sont surtout intéressantes par leur activité biologique, sont souvent bouleversées lors de la pénétration du carottier. D'autre part, le maniement

de ces appareils est souvent difficile et nécessite des embarcations importantes et extrêmement stables.

Une autre solution utilisée est la benne d'ECKMANN (1933), dont on peut trouver deux modèles différents : l'un dont le déclenchement est commandé par un messager, l'autre dont le déclenchement est automatique après l'arrêt de la benne sur le fond. Cette benne a l'avantage d'être relativement légère et maniable ; cependant, elle ne prélève pas à plus de 20 cm de profondeur et, d'autre part, lors de la fermeture, les couches de vase sont très mélangés sur les bords de l'engin.

La solution la plus souvent utilisée a été celle du carottier de JENKINS décrit par MORTIMER (1942), (Fig.2). Cet appareil, qui a été réalisé en 1946, n'est pas fabriqué industriellement ; il a donc fallu, en s'inspirant des plans et des dessins des auteurs, et en les modifiant légèrement, réaliser un appareil semblable. Ce carottier a l'énorme avantage de prélever la vase in situ, sans la modifier ; se présentant sous la forme d'un tube de 80 cm de long, cet appareil s'enfonce dans le sédiment, à une profondeur variant avec la résistance à la pénétration de ce dernier ; l'enfoncement du tube est favorisé par des pieds solidaires du tube et alourdis par des masselottes de plomb. La fermeture des deux extrémités du tube est réalisée par deux clapets montés sur des bras mobiles ; on arrive avec cet appareil à prélever des colonnes de vase de 30 à 40 cm de hauteur et de 10 cm de diamètre.

Il faut noter également que ce type de carottier permet de prélever l'eau sus-jacente aux couches de vase ; les mesures des diverses caractéristiques intéressantes dans la vase et dans l'eau sont aussi possibles ; des orifices, fermés par des bouchons vissés et ménagés dans la paroi du tube de 10 en 10 cm, permettent de prélever la vase à différents niveaux, il est évident que, dès que le sédiment comporte une proportion importante de graviers, l'appareil n'est pas utilisable.

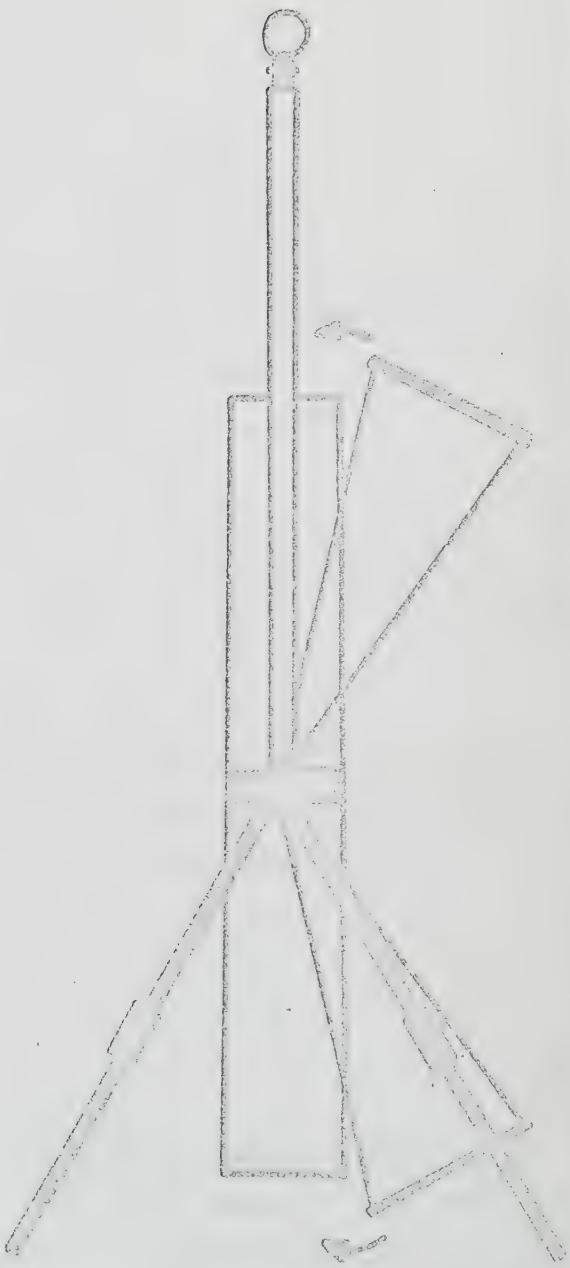


Fig. 2 -Carottier MORTIMER et JENKINS - Schéma de fonctionnement.

2) Eau

Les techniques de prélèvements d'eau destinés à l'analyse microbiologiques sont classiques. Il s'agit de bouteilles à renversement, type FRIEDINGER, stérilisées à l'alcool avant l'immersion dans l'eau, ou de différents systèmes dont le principe est le suivant : un flacon stérile, mis sur un bâti, est prolongé par un embout fermé à la flamme ; lorsque le flacon arrive à la profondeur désirée, un messager vient briser l'embout et le flacon se remplit ; il est ensuite bouché aussitôt qu'il est ramené à l'air libre.

Nous avons utilisé le "BATHYROPHE" décrit par BRISOU (1965). Il s'agit d'une bouteille à renversement en caoutchouc stérilisable à la chaleur.

Pour les prélèvements en surface, on utilise un simple flacon stérilisé débouché juste au moment du prélèvement, puis rebouché ensuite.

Dans le cas de l'eau comme de la vase, les dénombrements doivent être effectués le plus tôt possible après le prélèvement pour éviter la multiplication des germesaprès le prélèvement ; aussi, avons-nous aménagé une camionnette en laboratoire ambulant, permettant d'effectuer les ensemencements sur le terrain, lorsque le point choisi est éloigné du laboratoire.

C - ETUDE ECOLOGIQUE DE DEUX ETANGS : La Rouillie et Soustons

Les études écologiques des étangs de la Rouillie et de Soustons n'ont pu être menées de façon strictement identiques.

Un certain nombre de facteurs communs ont été mesurés dans les deux étangs. Pour des raisons matérielles, certains facteurs ont été ajoutés, d'autres retranchés, dans l'étang de Soustons par rapport à l'étang de la Rouillie ; ce dernier a été étudié chronologiquement le premier.

A la Rouillie comme à Soustons, les prélèvements sont effectués dans l'eau à l'aide du bathyrophe et dans la vase à l'aide du carottier MORTIMER et JENKINS.

a) Dans l'étang de la Rouillie, les prélèvements sont faits mensuellement. On a mesuré dans l'eau : température, oxygène dissous, azote ammoniacal, azote nitrique, nombre de germes ammonifiants. Dans la vase : température, matière organique, carbone, azote total, azote nitrique, azote ammoniacal, nombre de germes ammonifiants, nitrifiants, dénitrifiants et fixateurs anaérobies de l'azote ont été appréciés.

b) Dans l'étang de Soustons, les prélèvements ont été effectués deux fois par mois, sauf exception. Dans l'eau on a mesuré : température, oxygène dissous, azote ammoniacal, azote nitrique, azote nitreux, nombre de germes ammonifiants, nitrifiants, cellulolytiques et minéralisateurs du soufre organique. Dans la vase ont été évalués : température, azote ammoniacal, azote nitrique, nombre de germes ammonifiants, nitrifiants, cellulolytiques et minéralisateurs du soufre organique.

D - DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX ET MISE EN OEUVRE

Les expériences décrites ici, concernent le devenir de l'azote nitrique dans l'eau des étangs, la décomposition de la matière organique de la vase, la nitrification autotrophe et hétérotrophe et les gaz dégagés par les sédiments.

1) Devenir de l'azote nitrique

L'expérimentation exposée ici, a pour but de mettre en évidence le comportement de l'azote nitrique ajouté dans l'eau d'un étang, représenté par des modèles simplifiés (bacs, flacons en pyrex, bac sans fond immergé dans un étang . Le mode opératoire utilisé dans cette expérience est représenté sur la figure 3.

a) Essais en bacs

Huit bacs, mesurant 40 cm.x 60 cm. de hauteur reçoivent une

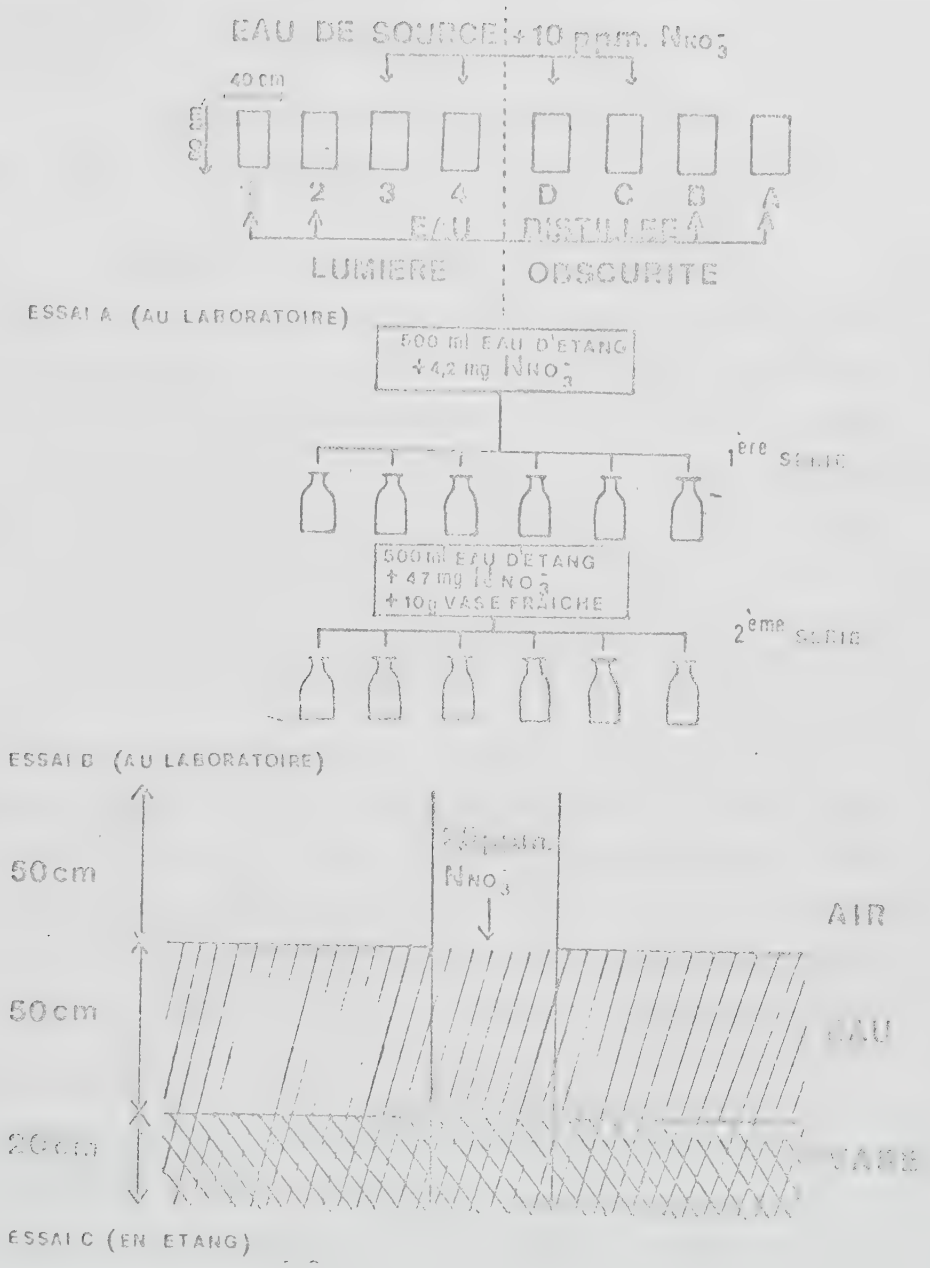


Fig. 3 – Schéma des dispositifs expérimentaux dans l'étude du devenir de l'azote nitrique.

épaisseur de 10 cm de vase, provenant d'un étang de pisciculture, préalablement tamisée sur les mailles de 1 cm. et homogénéisée. Quatre de ces bacs sont installés à l'obscurité et sont appelés A. B. C.et D., et les quatre autres sont placés en lumière atténuée et appelés 1, 2, 3 et 4 ; la pièce située au sous-sol où ils sont disposés, ne subit que de faibles variations de température. Les bacs obscurs sont à une température moyenne de 16°C et les bacs éclairés à 18°C. (la différence des température provient de la quantité de chaleur apportée par la lumière dans le 2ème cas).

Les bacs 1, 2, A et B reçoivent une quantité d'eau distillée, versée avec précaution, telle que la hauteur d'eau surmontant la vase soit de 25 cm. Les bacs 3, 4, C et D sont emplis de la même quantité d'eau de source. Des couvercles, transparents ou opaques (suivant le cas) sont placés pour empêcher les chutes de poussières ; ces couvercles ne sont pas étanches au gaz. L'eau de la source utilisée contient en moyenne 100 mg/l de calcium et présente un pH légèrement alcalin variant de 7,2 à 7,5. Elle a une teneur relativement élevée en azote, de 5,8 mg/l, presque entièrement sous la forme nitrique.

L'ensemble étant mis en place, un premier dosage est fait 14 jours après ; les dosages seront ensuite poursuivis jusqu'à ce que les variations deviennent faibles, montrant que les deux milieux, vase et eau, sont parvenus à un état d'équilibre relatif. C'est alors seulement que du nitrate de calcium sera ajouté. Le niveau dans les bacs est ajusté, lorsqu'il est nécessaire, avec de l'eau distillée.

Lorsque ce stade d'équilibre est atteint, les bacs 3, 4, C et D reçoivent donc du nitrate de calcium dissous dans un litre d'eau, en quantité calculée, de façon à amener la teneur de chaque bac aux environs de 10 mg/l d'azote nitrique. Les autres bacs reçoivent un litre d'eau sans nitrates. Chaque bac reçoit en plus 0,2 ml par litre d'eau du mélange d'oligoéléments utilisé normalement dans les milieux pour culture d'algues (PROVIOSI et PINTER, 1959), ceci, principalement, pour éliminer l'éventualité de troubles pouvant résulter d'une carence ; le rôle du molybdène, en particulier, ayant déjà été signalé comme important dans le métabolisme de l'azote. La nouvelle série de dosages commence trois jours après avoir ajouté le nitrate.

Afin de raccorder les variations constatées à un phénomène biologique existant, une numération des germes de la dénitrification a été entreprise parallèlement sur des prélèvements d'eau des bacs.

b) Essais en flacons en verre

Six flacons droits, en verre, de 750 ml, sont bouchés au coton pour permettre les échanges gazeux, et stérilisés à sec.

Une première série de 6 flacons reçoit 500 ml de l'eau de l'étang précédent ; on ajoute alors dans chaque flacon une certaine quantité de nitrate de calcium ; les flacons sont mis à la température du laboratoire (20°C). On fait un premier dosage sur un des flacons au bout de 30 jours et un deuxième dosage sur l'ensemble de flacons restants (en prenant la moyenne), au bout de 64 jours.

Les dosages sont conduits en versant chaque fois la totalité du flacon dans la fiole de Kjeldahl utilisée.

Une deuxième série de 6 flacons reçoit 500 ml d'eau provenant du même étang et 10 g de vase fraîche, humide, bien homogénéisée au préalable. On ajoute dans chaque flacon 20 mg de nitrate de calcium. Au bout de 30 jours, sur l'un des flacons, on fait un dosage de l'azote minéral dans la vase et l'eau décantée. Au bout de 64 jours, on fait dans 3 flacons un dosage d'azote minéral dans l'ensemble vase et eau, et sur 2 flacons un dosage de l'azote total dans la vase et l'eau décantée.

c) Essais en étang

Le bac sans fond est réalisé par collage de quatre plaques standard d'altuglass, pour former un parallélépipède de 80 cm de côté et de 1,20 m de hauteur. Ce bac a été disposé dans l'étang "le Miroir" où aucune pêche n'a été faite pendant la durée des essais ; les parois du bac étaient enfoncées dans la vase sur hauteur de 20 cm environ, et surmontaient la surface de l'eau de 50 cm. La vase s'est trouvée, en

permanence surmontée d'une épaisseur d'eau variant peu autour de 51 cm dans le bac comme dans l'étang lui-même.

Les mesures ont débuté en Décembre, pour être terminées en Juin de l'année suivante, ce qui a permis de vérifier le comportement satisfaisant du matériel au gel superficiel de l'eau. Une faible quantité d'azote nitrique (2,5 mg) a été ajoutée le deuxième jour dans le bac pour simuler une fertilisation.

Le 15 Juin, lors de la fin des mesures, 6 carottes de vases sont prélevées dans le bac et 6 autres dans l'étang, à proximité immédiate du bac. Le centimètre superficiel de 3 carottes de chaque groupe est recueilli soigneusement pour le dosage des formes de l'azote, sur les 3 carottes restantes de chaque série ; ont été faites les mesures de pH et de potentiel d'oxydo-réduction, de centimètre en centimètre.

2) Décomposition de la matière organique

On étudie ici, la minéralisation de deux types de matière organique ajoutée à la vase :

- Matière organique à rapport C/N bas : poudre de luzerne C/N = 10, teneur en azote total : 5,6 % de la matière sèche
- Matière organique à rapport C/N élevé : poudre de feuilles de chêne C/N = 33 - Teneur en azote total : 1,4 % de matière sèche.

La poudre de luzerne a été fournie par l'usine d'aliments du bétail de l'Institut National de la Recherche Agronomique, à la Minière.

La poudre de feuilles de chêne a été obtenue en passant dans un broyeur à paille, des feuilles de chêne pédonculé, provenant des alentours de l'étang de la Rouillie et séchées ensuite naturellement avant d'être réduites en poudre.

Dans les deux cas, on mélange 10 grammes de poudre sèche à 1.000 grammes de vase humide (environ trois pour cent en matière sèche).

25 kilos de mélange sont ainsi préparés et versés dans un bac parallélépipédique en altuglass de 60 cm de long sur 40 cm de large et 40 cm de hauteur. Le mélange occupe une hauteur de 10 cm environ : on ajoute ensuite avec précaution 60 litres d'eau de l'étang.

La hauteur d'eau surmontant la vase est alors de 25 cm ; le niveau d'eau est repéré dans chaque bac et les pertes sont compensées par de l'eau distillée.

A intervalles réguliers, on mesure dans l'eau le pH et le rH ; on évalue l'oxygène et les formes de l'azote ; au début et à la fin de chaque expérience, les formes de l'azote et le carbone organique sont dosés dans la vase.

On a également dénombré, trois fois au cours de l'expérience, le nombre de germes ammonifiants dans l'eau et dans la vase.

Il n'a pas été matériellement possible de répéter véritablement l'expérience. Cependant, trois séries de deux bacs identiques ont été réalisées : deux, contenant la vase enrichie en poudre de luzerne, deux, avec la vase enrichie en poudre de feuilles de chêne, et deux bacs témoins.

3) Nitrification autotrophe et hétérotrophe

Dans certains des différents biotopes déjà présentés, ont été faits les dosages des formes de l'azote minéral. On a également effectué des expériences de laboratoire sur la nitrification et des isolements d'Arthrobacter dans la vase de l'étang de la Rouillie.

a) Etude écologique

Les travaux sur le terrain sont réalisés :

- Dans l'étang de la Rouillie (forêt de Compiègne) des prélèvements mensuels sont effectués : cet étang qui ne comporte pas de déversements d'origine

urbaine, agricole ou industrielle peut être considéré comme non pollué ;

- Dans plusieurs lacs et étangs, situés dans diverses régions de France et choisis pour obtenir un échantillonnage varié, un seul prélèvement a été fait dans chacun de ces milieux, au cours des mois d'été.

La vase et l'eau sont prélevées à l'aide du matériel classique : benne d'Ekman, carottier de Mortimer et Jenkins, échantillonneur d'eau décrit par Brisou, sous le nom de Bathyrophe.

b) Etude au laboratoire

Deux modèles d'écosystème aquatique sont réalisés. Ils comprennent chacun une phase solide : vase issue de l'étang de la Rouillie et une phase liquide : milieu de culture synthètique. Ils diffèrent par les conditions d'aérations qui y règnent : le premier modèle est anaérobie, le deuxième est aérobie.

- Premier modèle

La phase liquide et la phase solide sont introduites dans un récipient en verre, en forme d'ampoule d'un volume de 1 litre (fig. 4).

Ce récipient est voisin de celui qu'utilisait FEUILLADE (1965) qui a fait varier le potentiel "redox" et étudié la précipitation et la dissolution du fer sous forme d'oxyde.

A la partie supérieure du récipient, se trouvent 4 orifices obturés par des bouchons de caoutchouc renfermant respectivement, un thermomètre, une électrode de référence, une électrode de platine et un tube communiquant avec une trompe à eau ; à la partie inférieure de l'ampoule, arrive un courant d'azote, lequel barbote dans le milieu et élimine ainsi l'oxygène dissous qui proviendrait de fuite éventuelle.

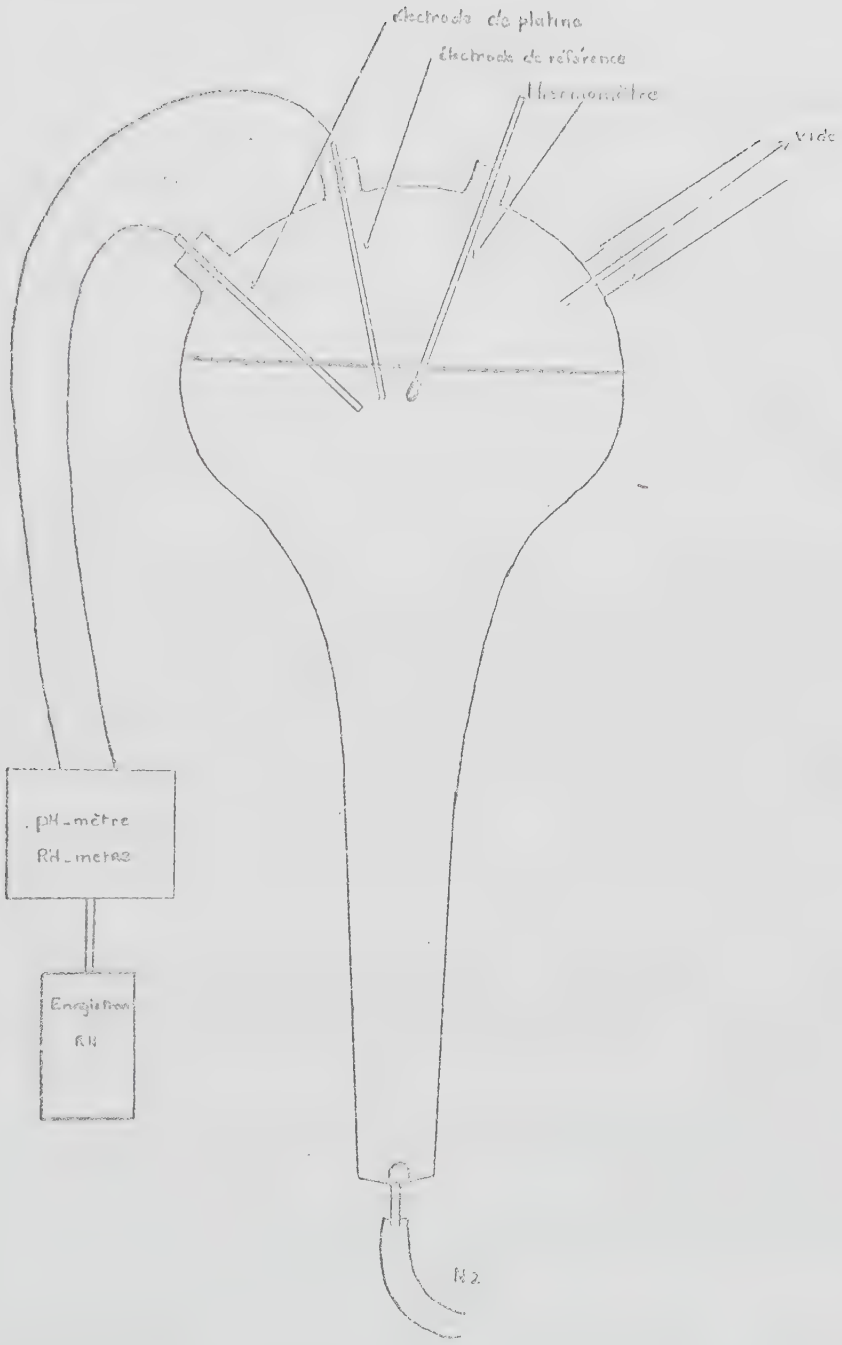


Fig. 4 - Ampoule pour étude de la nitrification en anaérobiose.

En réglant le débit d'azote et le vide, il est possible de stabiliser relativement le potentiel "redox du" milieu ; le réglage ne se fait que par tâtonnement. Les débits ne sont pas chiffrables. Le rH est enregistré au cours de l'expérience.

- Deuxième modèle

La phase liquide et la phase solide sont introduites dans une fiole d'Erlenmeyer stérile et bouchée au coton ; le potentiel "redox" n'est pas contrôlé ; on considère que l'incubation, à 28°C, a lieu en aérobiose.

- Identification et isolement des Arthrobacter

Le nom d'Arthrobacter a été introduit en 1947, et on s'accorde actuellement pour placer ce genre parmi les Corynebactéries. Leurs propriétés morphologiques et physiologiques ont été étudiées par LOCHEAD (1957) et MULDER ET ANTHEUNISSE (1963). Les souches d'Arthrobacter utilisées sont isolées de la vase qui sert de matériel dans l'ensemble de ce travail ; la technique d'isolement employée est celle de MULDER et ANTHEUNISSE (1963), dont nous rappellons le principe plus loin.

- Cultures d'Arthrobacter

Les cultures d'Arthrobacter sont réalisées en anaérobiose et aérobiose, c'est-à-dire dans les modèles n° 1 et n° 2.

4) Gaz dégagés par les sédiments

a) Prélèvements in situ

Il s'agit d'examiner la composition du mélange gazeux provenant directement de l'étang ; le gaz est prélevé à l'aide d'un entonnoir et d'une éprouvette graduée étanche, préalablement remplie d'eau. Le mélange est ensuite analysé de la même manière que ci-dessous.

b) Etude au laboratoire sur des modèles écologiques simples

La méthode consiste à introduire un échantillon de vase et un milieu de culture dans une fiole, à dégazer soigneusement son contenu, et, enfin, à mettre l'ensemble en incubation à 28°C pendant un nombre de jours qui varie avec les possibilités d'utilisation du matériel. A l'issue de l'expérience, le mélange gazeux est analysé à l'aide d'un spectromètre de masse de type ATLAS, CH_4. Les essais sont numérotés de 1 à 10 (témoin) et présentés dans le tableau 1. La vase est prélevée à l'aide de la benne d'Eckman, puis conservée pendant trois jours pour les n° 1, 2 (vase du bord de l'étang), dix jours pour les n° 3, 4 et 5 (vase du centre de l'étang), cinq jours pour le n°6 (vase du lac de Nantua) et deux mois pour les n°7, 8, 9 et 10 (vase du centre de l'étang). En effet, il a semblé préférable d'utiliser le même échantillon pour l'ensemble de l'expérimentation.

Les fioles utilisées sont identiques à celles décrites par CHAIGNEAU et al. (1965), (fig.5). Ce sont des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml contenant chacune 50 ml de milieu de culture et sur lesquelles on adapte un tube muni d'un robinet assurant la liaison avec une trompe ; le vide est réalisé dans la fiole aussitôt après l'ensemencement par la vase, de façon à éviter toute cause d'erreur. Après l'incubation, on prélève le gaz au-dessus d'une cuve à mercure à l'aide d'une trompe de Sprengel.

Le volume du mélange est alors déterminé à l'aide d'une jauge graduée ; le mélange gazeux est ensuite introduit pour analyse dans le spectromètre de masse. Les phases solides utilisées dans les diverses expériences proviennent de l'étang de la Rouillie, à l'exception de l'une d'entre elles, constituée par la vase du lac de Nantua. Les gaz sont prélevés dans la mesure du possible chaque semaine, mais, pour des raisons matérielles, ils sont analysés à intervalles plus éloignés.

Le tableau 1 récapitule l'ensemble des dispositifs utilisés, en précisant, pour chaque expérience, la composition qualitative et quantitative des phases solides (vase) et phases liquides (milieu) utilisées :

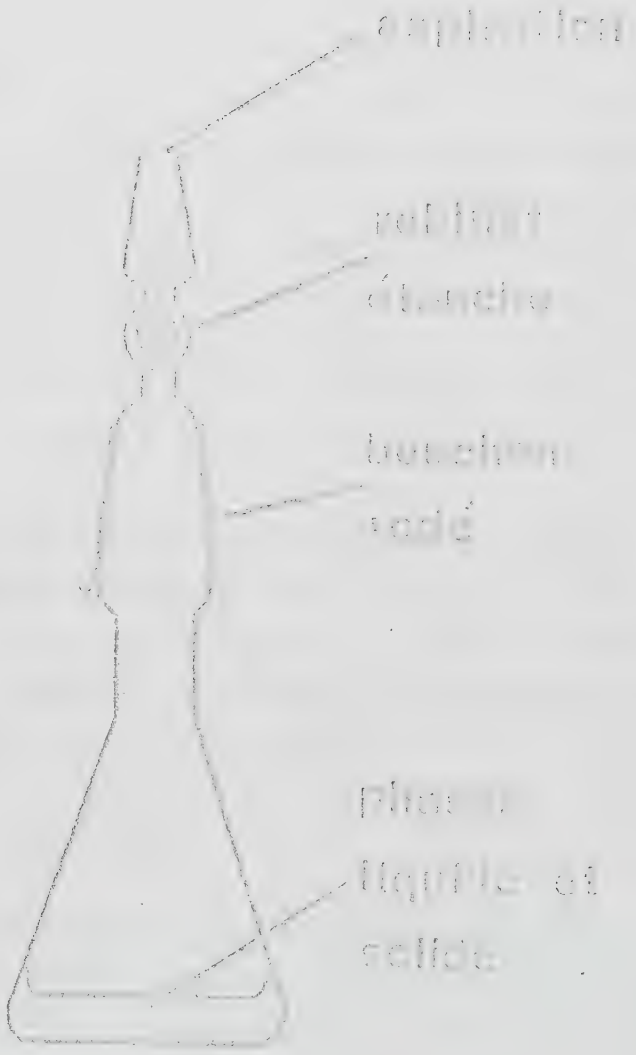


Fig. 5 - Fiole de CHAIGNEAU pour étude des gaz.

UMERO DE	PHASE SOLIDE		PHASE LIQUIDE	
	Origine de la vase	Poids, en g, de matière sèche	Composition	Volume en ml
1	La Rouillie. (bord de l'étang)	2,55	Urée 1g Glucose 1g Eau distillée 1000ml	50
2	La Rouillie. (bord de l'étang)	2,58	Asparagine 1g Eau distillée 1000ml	50
3	La Rouillie. (centre de l'étang)	6,77	Asparagine 1g Eau distillée 1000ml	50
4	La Rouillie. (centre de l'étang)	7,12	Glycocolle 1,140g Eau distillée 1000ml	50
5	La Rouillie. (centre de l'étang)	5,95	Glycocolle 5,357g Eau distillée 1000ml	50
6	Lac de Mantua	9,65	Glycocolle 5,357g Eau distillée 1000ml	50
7	La Rouillie. (centre de l'étang)	7,58	Glycocolle marqué 1,140 g (95 %) Eau distillée 1000ml	100
8	La Rouillie. (centre de l'étang)	1,17	Eau "Vittel-Cote"	100
9	La Rouillie. (centre de l'étang)	7,58	Ca $(^{15}NO_3)_2$ 95 % 6g Eau distillée 1000ml	100
10	La Rouillie. (centre de l'étang)	6,77	Témoin Eau distillée	50

- [illegible]

La phase liquide contient la substance azotée ajoutée à la vase : l'urée pour l'une des expériences (N°1), l'asparagine pour deux autres (n° 2 et 3), glycocolle pour les n° 4, 5 et 6, glycocolle marqué à 95 % avec l'azote lourd dans l'expérience n° 7 , le milieu liquide de Tolls (PREVOT, 1960) dans l'expérience n°8, du milieu destiné à apporter à la microflore l'ensemble des [illegible].

- Apport d'azote nitrique

L'expérience n°9 est réalisée pour vérifier l'existence de la dénitrification dans la vase de l'étang de la Rouillie. On utilise une phase liquide enrichie au nitrate de calcium marqué $Ca\ (^{15}NO_3)_2$ à 95 %.

- Témoin (expérience n°10)

Nous avons pris un témoin pour l'ensemble des expériences : la phase solide est constituée par la vase de la Rouillie (centre de l'étang). L'idéal aurait été de choisir trois témoins puisque les phases solides proviennent de trois biotopes différents (bord de l'étang de la Rouillie, centre de l'étang, lac de Nantua). Il n'a pas été matériellement possible de le faire ; cependant, l'inconvénient est faible, car une seule expérience est accomplie avec la vase du lac de Nantua et, en ce qui concerne la vase du bord de l'étang, ses caractéristiques sont voisines de celles de la vase du centre.

c) Analyse des gaz dégagés par les sédiments

Le mélange gazeux dégagé est prélevé dans une éprouvette graduée ; le dosage du CO_2 s'effectue immédiatement à l'aide d'une solution de NaOH N/10 ; ensuite, le mélange résiduel est injecté dans le spectromètre de masse ; les résultats sont enregistrés directement sur papier ; les pics correspondent aux différentes masses moléculaires des composants du mélange. Comme ce composant n'existe qu'en faible quantité, il est nécessaire, pour le doser, d'utiliser un produit de référence pour étalonner l'appareil.

E - DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES PHYSIQUES

1) Température

La température est mesurée sur le terrain à l'aide d'une sonde thermoélectrique type METRIX, dans le cas de mesures faites dans les lacs profonds, et à l'aide d'un simple thermomètre, dans le cas du laboratoire et des étangs de faible profondeur.

2) pH et rH

La notion de pH est bien connue et il n'est pas besoin d'y revenir. Par contre la notion de rH cologarithme de la pression en hydrogène moléculaire dans un milieu, est moins classique. Rappelons que le rH caractérise l'état d'oxydo-réduction d'un milieu et conditionne les équilibres "redox"; si, dans un équilibre, où l'on trouve une forme réduite dont la concentration est " Red ", une forme oxydée "Ox", le rH dépendra du rapport "Red"/"Ox" Pour un rH bas, on aura "Red" > "Ox" et l'équilibre tend vers l'anaérobiose ; par contre pour un rH élevé "Ox" > "Red", l'équilibre tend vers l'aérobiose

L'état d'oxydo-réduction d'un milieu peut également s'exprimer sous forme d'un potentiel d'oxydo-réduction Eh.

Il existe évidemment une relation entre Eh et rH que nous expliciterons plus loin.

a) Matériel

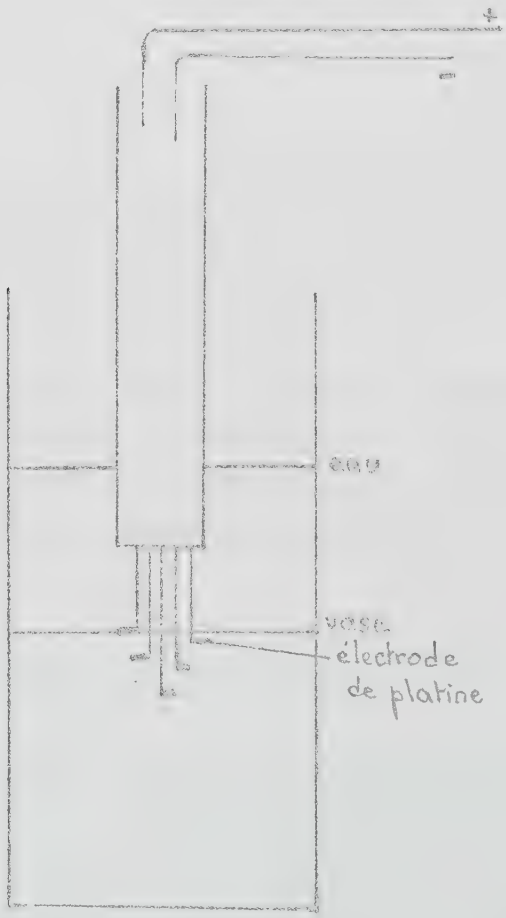
Le principe des appareils de mesure, destiné à mesurer à la fois le pH et le rH est le suivant :

- le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre classique auquel on adjoint une électrode de platine ; le Eh ou rH, car l'appareil possède en général les deux graduations, est mesuré entre l'électrode de référence du pH-mètre (hydrogène ou chlorure d'argent ou calomel) et l'électrode de platine.

Le matériel utilisé pour la mesure du rH et du Eh peut être, soit portatif, soit de laboratoire :

- Matériel portatif : les électrodes sont reliées à un voltmètre portatif, alimenté par piles et ayant le cadran gradué en Eh et en rH_2. Pour les mesures à l'intérieur de la vase, on utilise des électrodes-sondes ; L'appareil que nous avons employé est un pH-mètre PONSELLE ;

- Matériel de Laboratoire : dans l'expérience sur le devenir de l'azote nitrique, on utilise un faisceau d'électrodes de platine (électrodes réalisées d'après les indications de MORTIMER, modifiées par A. WURTZ.



L'appareil est disposé de façon que l'électrode n°1 soit dans l'eau et l'électrode n°2 exactement à l'interface vase-eau ; les suivantes sont alors espacées, en dessous, de centimètres en centimètres. Mais souvent, des corps durs tels que des fragments de végétaux, gênent l'enfoncement du faisceau. L'électrode de référence est une électrode au calomel. Dans la suite du travail, on a utilisé un pH-mètre PONSELLE alimenté sur secteur avec électrode de référence au chlorure d'argent.

b) Mesures et interprétation

Il convient de souligner que le rH varie avec :

- la température (assez peu entre 15°C et 20°C)
- le pH
- le potentiel de l'électrode de référence utilisée en couplage avec l'électrode de platine (il s'agit du potentiel par rapport à l'électrode d'hydrogène, laquelle est théorique).

Il semble donc que toute donnée relative au rH doit être accompagnée du pH du milieu et du potentiel de l'électrode de référence, pour permettre au lecteur qui le désire, de repasser au Eh.

Ainsi, à 20°C, dans le cas d'une électrode à AgCl, on aura :

$$Eh = -203 + 30\ rH - 60pH$$

Nous avons utilisé la notion de potentiel "redox" dans l'étude du devenir de l'azote nitrique et dans celle de la nitrification. Cependant, comme l'a noté STUMM (1965), si le potentiel "redox" est une notion précise lorsqu'on est en présence d'un seul équilibre chimique, sa signification est beaucoup plus discutable lorsqu'on se trouve dans un milieu naturel, en présence d'un mélange d'équilibre. Dans ce dernier cas, les mesures de potentiel "redox" ne peuvent donner que des indications approximatives.

F - ANALYSES CHIMIQUES

Les méthodes d'analyses employées sont, pour la plupart, classiques en pédologie et en analyse des eaux. Elles sont simplement rappelées dans leur principe, avec les modifications apportées du fait qu'il s'agit, ici, de vase ou d'eau.

Les techniques utilisées pour l'analyse des eaux sont décrites dans RODIER (1960). Celles qui concernent la vase, sont citées par DUCHAUFOUR (1960).

1) La vase

Matière sèche : mesure effectuée sur 100 g de vase humide séchée à 105°C jusqu'à poids constant.

Matière organique : déterminée par la perte au feu à 600°C.

Carbone : déterminé par la méthode ANNE.

Azote total : attaque selon le protocole KJELDAHL, puis acidimétrie après distillation de NH_3 formée par minéralisation, suivant la technique classique de PARNAS et WAGNER. Les formes d'azote sont dosées selon la méthode légèrement modifiée décrite par DUCHAUFOUR (1960) pour les sols : le séchage à l'air de la vase entraînerait,en effet, de grandes modifications dans les teneurs respectives des formes de l'azote : les formes réduites ont, en effet, tendance à s'oxyder très rapidement sous l'action de l'oxygène de l'air.

Dans les dosages de la vase, nous sommes donc partis d'échantillons humides égouttés, et la teneur en eau a été mesurée chaque fois, afin qu'on puisse rapporter les résultats au poids sec. Le principe est le suivant : la vase est agitée en présence d'une solution normale de chlorure de calcium, puis filtrée ; on dose les formes de l'azote sur le filtrat, d'après les principes suivants :

Azote ammoniacal - Distillation puis dosage par acidimétrie.

Azote nitrique - Dosé par acidimétrie sur le distillat après réduction des nitrates par l'alliage Dewarda.

Azote nitreux - Méthode de ROBINSON et THOMPSON (1948). Réduction des nitrites par l'acide sulfonique. Le composé formé réagit avec la naphthylamine et donne un corps coloré dosable par spectrophotocolorimétrie.

2) L'eau

Oxygène dissous : dosé par la méthode de WINKLER.

Azote total, nitreux, nitrique, ammoniacal : même technique que pour la vase, sauf dans le cas de l'étang de Soustons, où les formes de l'azote minéral sont dosées par les techniques de la trousse HACH, car nous ne disposions pas d'un laboratoire de chimie complet ; pour le dosage des formes de l'azote dans l'eau, la trousse HACH donne des résultats suffisamment précis.

Azote ammoniacal - Utilisation de la réaction de NESSLER.

Azote nitreux - Dosé par le réactif de GRIESS.

Azote nitrique - Réduit en azote nitreux par l'acide sulfonique - naphthylamine en présence de cadmium. L'azote nitreux est ensuite dosé comme dans la vase.

Hydroxylamine - Méthode de NOWAK et WILSON (1962) : l'hydroxylamine est oxydée en nitrite par l'acétate de sodium. Les nitrites sont évalués ensuite de la même façon que précédemment.

3) Analyses chimiques particulières

Dans l'étude du devenir de l'azote nitrique, on a dosé l'azote sous forme d'acide aminé en utilisant la technique suivante :

Dans un litre d'eau, on ajoute 5 g de trypsine, puis on ajuste le pH à 7,5 et l'eau est placée à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Après ce temps, on filtre et on fait passer sur une colonne de résine échangeuse d'ions (Amberlite I.R. 120), placée sous la forme acide à l'aide de l'acide chlorhydrique; on procède à l'élution avec de l'ammoniaque. Les acides aminé sont ensuite repris dans le résidu de l'évaporation sous vide et traités par

la méthode donnée par JOBIN et YVON (1964) et enfin révélés à l'aide du réactif à la ninhydrine.

G - ETUDES MICROBIOLOGIQUES

Trois catégories de recherches ont été poursuivies : évaluation de la microflore totale; appréciation de l'activité des groupes physiologiques et plus particulièrement, rôle des Arthrobacter dans la nitrification.

1) Conditions d'ensemencement sur le terrain - Dénombrement des germes.

Lorsque le point de prélèvement est éloigné du laboratoire, il arrive que le temps qui s'écoule entre le moment du prélèvement et celui de l'ensemencement, soit assez long. Si cette durée excède cinq heures, il est admis classiquement que la microflore a eu le temps d'évoluer suffisamment pour que l'analyse soit entachée d'erreur. Nous l'avons également vérifié ,LAURENT (1965).

En nous inspirant de RODINA (1969) décrivant une enceinte stérile transportable, nous avons été amenés,pour effectuer les ensemencements destinés à la numération des différents groupes physiologiques de germes, à utiliser un laboratoire ambulant ; il s'agissait d'une camionnette équipée en laboratoire de microbiologie simple.

Les équipements, différents de ceux nécessaires pour les études chimiques, consistent en installation d'une paillasse sur un des côtés de la camionnette ; un évier avec alimentation en eau par une pompe électrique est installé sur la paillasse, ainsi qu'un bec BUNSEN alimenté par une bouteille de gaz butane. Si possible, le poste d'ensemencement est recouvert d'une enceinte semblable à une boite à gant, stérilisable par une lampe à ultra-violets.

L'éclairage est assuré par des lampes électriques classiques et par une vitre située au-dessus de la paillasse. Le long des parois de la

camionnette, situés sous la paillasse, et lui faisant vis-à-vis, sont placés des placards destinés au rangement des tubes, avant et après ensemencement. Pour gagner du temps, ceux-ci peuvent être disposés sur des portoirs, avant le départ.

- Dénombrement des germes

Le dénombrement des groupes physiologiques et de la microflore totale a été effectué par la technique classique des suspensions-dilutions de vase et eau et inoculé dans un milieu contenant un substrat caractéristique du groupe étudié, et dont l'attaque et ultérieurement mise en évidence par une réaction chimique. On ensemence 3 ou 5 tubes par dilution suivant la précision désirée, puis, au cours de l'incubation, on effectue des lectures à des intervalles de temps déterminé. Pour chaque lecture, on définit l'Indice de Dilution Moyenne (I.D.M.) égal au nombre total de tubes positifs divisé par le nombre de tubes par dilution. On voit que l'I.D.M. est approximativement égal au logarithme décimal du nombre le plus probable de germes. Ce dernier nombre est donné par les tables de MAC GRADY. L'interprétation des résultats, l'établissement des courbes d'activité, sont exposés par POCHON et TARDIEUX (1960). Pour le dénombrement des Arthrobacter, on a utilisé des milieux gélosés en boîtes de Petri.

2) Microflore totale

Les milieux utilisés pour la microflore totale et les groupes physiologiques sont pour la plupart décrits par POCHON et TARDIEUX (1960). Cependant, CALANDRON et al.(1962), ayant montré une prédominance de la microflore anaérobie dans les sédiments aquatiques, on utilise chaque fois que cela est possible, des milieux répartis en tubes étroits sur une grande hauteur et légèrement enrichis de peptones diverses, car les anaérobies sont, en général, plus exigeants que les aérobies.

Dans la plupart de nos milieux, nous avons utilisé la solution saline de WINOGRADSKY ou solution saline standard, ainsi qu'une solution d'oligoéléments ; ces solutions sont composées comme suit :

Solution saline de WINOGRADSKY

- Phosphate bipotassique	: 5 g
- Sulfate de magnésium	: 2,5g
- Chlorure de Sodium	: 2,5g
- Sulfate ferrique	: 0,05 g
- Sulfate de Manganèse	: 0,05 g
- Solution d'oligoéléments	: 1 ml
- Eau distillée q.s.p	: 1000

Solution d'oligoéléments

- Molybdate de potassium	: 0,05 g
- Borate de sodium	: 0,05 g
- Perchlorure de fer	: 1 goutte
- Nitrate de cobalt	: 0,05 g
- Sulfate de cadmium	: 0,05 g
- Sulfate de cuivre	: 0,05 g
- Sulfate de zinc	: 0,05 g
- Sulfate de manganèse	: 0,05 g
- Eau distillée q.s.p	: 1.000

Au début de notre travail, KAISER et LAURENT (1964), nous avons utilisé le milieu suivant pour la microflore totale :

- Extrait de terre	: 500 ml
- Bactopeptone Difco	: 0,5 g
- Trypticase	: 0,5 g
- Extrait de levure Difco	: 0,2 g
- Eau distillée q.s.p	: 1.000

Répartition à raison de 9 ml en tube de 14 mm.

Dans la suite, le milieu microflore totale n'a plus été utilisé ; en effet, à la suite de comparaison entre différentes vases, on a montré (LAURENT, 1964) que le milieu "ammonification" tel qu'il est décrit ci-dessous donnait, dans le cas des vases et des eaux, une meilleure représentation de la microflore totale que le milieu classique utilisé :

Milieu "ammonification"

- Solution saline de WINOGRADSKY	: 50 ml
- Solution d'oligoéléments	: 1 ml
- Asparagine	: 0,5 g
- Bactopeptone Difco	: 0,1 g
- Trypticase	: 0,1 g
- Levure	: 0,1 g
- Eau distillée q.s.p	: 1.000 ml

Répartition comme précedemment.

3) Groupes physiologiques

a) Ammonification : milieu précédent

b) Fixation anaérobie de l'azote gazeux

- Solution saline standard	: 50 ml
- Phosphate monopotassique	: 0,75 g
- Soude décinormale	: 33 ml
- Glucose	: 10 g
- Extrait de terre	: 10 ml
- Solution d'oligoéléments	: 1 ml
- Eau distillée q.s.p	: 1000 ml

c) Protéolyse

- Solution saline standard	: 50	ml
- Gélatine	: 30	g
- Solution d'oligoéléments	: 1	ml
- Peptone	: 0,1	g
- Trypticase	: 0,1	g
- Levure	: 0,1	g
- Eau distillée q.s.p.	: 1000	ml

Faire fondre à chaud la gélatine dans le milieu salin.

d) Nitrification

Pour ferments nitreux :

- Solution saline standard	: 50	ml
- Sulfate d'ammonium	: 0,5	g
- Carbonate de calcium	: 1	g
- Eau distillée	:950	ml

Pour ferments nitriques

- Solution saline standard	: 50	ml
- Nitrite de sodium	: 1	g
- Carbonate de calcium	: 1	g
- Eau distillée	:950	ml

e) Dénitrification

- Solution saline standard	: 50	ml
- Nitrate de potassium	: 2	g
- Glucose	: 10	g
- Carbonate de calcium	: 5	g
- Solution d'oligoéléments	: 1	ml
- Eau distillée q.s.p	:1000	ml

Répartir en tubes à essais de 22, à raison de 10 ml par tube ; boucher au coton ; stériliser à 1'autoclave 20 minutes à 100°C.

f) Amylolyse

- Solution saline standard	: 50	ml
- Extrait de terre	: 10	ml
- Amidon de riz	: 1,5	g
- Nitrate d'ammonium	: 1	g
- Solution d'oligoéléments	: 1	ml
- Peptone	: 0,1	g
- Trypticase	: 0,1	g
- Levure	: 0,1	g
- Eau distillée q.s.p	:1000	ml

g) Pectinolyse :(milieu inédit) technique, WIERINGA (1953) et KAISER (1961)

α. Base de gélose : faire des géloses inclinées en tube de 14mm.

- Gélose Difco	: 22	g
- Chlorure de calcium	: 5	g
- Eau distillée	:1.000	ml

Ajuster à pH 8,5.

β. Solution de pectine : verser sur 8 g de pectine de pomme (ruban rouge Unipectine) mouillée par 15 ml d'éthanol, la solution suivante portée à ébullition :

- Extrait de terre	: 20	ml
- Solution saline de Winogradsky	: 50	ml
- Nitrate d'ammonium	: 2	g
- Peptone	: 0,1	g
- Trypticase	: 0,1	g
- Levure	: 0,1	g
- Eau distillée q.s.p	:930	ml

Ajuster à pH 8. Répartir 18 ml en tubes de 22 mm. Mettre dans chaque tube 4,3 ml de suspension-dilution de sédiment et répartir sur les tubes de gélose inclinée, décrits en α.

h) Cellulolyse aérobie

- Solution saline standard : 50 ml
- Nitrate d'ammonium : 1 g
- Extrait de terre : 20 ml
- Solution d'oligoéléments : 1 ml
- Eau distillée q.s.p : 1.000 ml
- Cellulose : Bande de papier filtre

i) Cellulolyse anaérobie

- Solution saline standard : 50 ml
- Nitrate d'ammonium : 2 g
- Peptone : 1 g
- Extrait de terre : 20 ml
- Carbonate de calcium : 3 g
- Peptone : 0,1 g
- Trypticase : 0,1 g
- Levure : 0,1 g
- Eau distillée q.s.p : 1.000 ml
- Cellulose : Bande de papier filtre

j) Lipidolyse anaérobie (Milieu inédit, technique de SIERRA (1957) et SEBALD (1959) :

- Solution saline de WINOGRADSKY : 50 ml
- Extrait de terre : 20 ml
- Nitrate d'ammonium : 2 g
- Peptone : 0,5 g
- Trypticase : 0,5 g
- Levure Difco : 0,2 g
- Chlorure de calcium : 0,1 g
- Gélose Difco : 18 g
- Eau distillée q.s.p : 930 ml

Dissoudre la gélose dans la solution, ajouter 3 ml de Tween 60 indispensable pour assurer la croissance de lipidolytiques et ajuster à pH 7,4, avec la soude. Ensemencer 1 cm3 de suspension-dilution par tube (maintenu à 45°C) ; les colonies lipidolytiques s'entourent d'un précipité blanchâtre.

k) Sulfatoréducteurs

- Chlorure d'ammonium	: 1 g
- Phosphate bipotassique	: 0,5g
- Sulfate de magnésium	: 2 g
- Sulfate de sodium	: 0,5g
- Chlorure de calcium	: 0,1g
- Lactate de sodium, en solution à 60p.100	: 6 ml
- Eau distillée q.s.p	:1000 ml

l) Minéralisation anaérobie du soufre organique

- Chlorure d'ammonium	: 1 g
- Phosphate bipotassique	: 0,5g
- Chlorure de calcium	: 0,1g
- Lactate de sodium à 60 %	: 5 ml
- d-l-Méthionine	: 1 g
- Citrate de fer ammoniacal	: 0,5g
- Extrait de terre	: 20 ml
- Eau distillée	:1000 ml

m) Sulfoxydants aérobies

- Phosphate bipotassique	: 0,25 g
- Chlorure de magnésium	: 0,10 g
- Chlorure de sodium	: 0,10 g
- Nitrate d'ammonium	: 2 g
- Carbonate de calcium	: 5 g
- Eau distillée q.s.p	: 1000 ml

n) Photosynthèse : Athiorhodaceae

- Extrait de terre	:	20 ml
- Solution saline de Winogradsky	:	50 ml
- Oligoéléments	:	1 ml
- Trypticase	:	0,5g
- Peptone Difco	:	0,5g
- Chlorure d'ammonium	:	0,5g
- Acétate de sodium	:	1 g
- Lactate de sodium 60 %	:	1,5ml
- Eau distillée q.s.p	:	930 ml

Répartition 8 ml en tubes de 14. Après ensemencement, couler sur la surface du milieu 3 ml du mélange paraffine (1 volume) - huile de paraffine (9 volumes). Incuber à 25 cm d'une lampe à incandescence de 25 W pendant trois semaines.

4) Milieu de culture pour Arthrobacter

a) Technique de MULDER et ANTHEUNISSE

Les suspensions-dilutions de terre sont agitées et ensemencées sur des boites de Petri remplies d'un milieu, appelé milieu pauvre, dont la composition est la suivante :

- $CaHPO_4$	:	0,25 g
- K_2HPO_4	:	1 g
- $MgSO_4,7H_2O$	:	0,25 g
- $(NH_4)_2\ SO_4$	:	0,25 g
- Caséine	:	1 g
- Extrait de levure	:	0,7 g
- Glucose	:	1 g
- Gélose	:	10 g

pH ajusté à 7. Après 5 jours d'incubation à + 25°C, dénombrements des colonies et transfert sur tubes gélosés de la même composition. Après

7 jours d'incubation à + 25°C, en tubes, on transfère les colonies sur milieu riche (milieu pauvre + glucose 10 g) et sur milieu pauvre en tubes. Après 7 jours d'incubation sur les deux milieux, l'aspect des germes, en cocci sur milieu riche, en V sur milieu pauvre, permet leur identification.

Les cultures issues du milieu pauvre sont alors transférées en milieu liquide dont la composition est la suivante :

- K_2PO_4H : 1 g
- $MgSO_4\ 7H_2O$: 0,3g
- $CaCl_2\ 2H_2O$: 0,05g
- $FeCl_3\ 5H_2O$: 0,01g
- $CuSO_4\ 5H_2O$: 0,1mg
- $ZnSO_4\ 7H_2O$: 0,1mg
- $MnSO_4\ 7H_2O$: 1 mg
- MoO_4Na_2 : 0,01mg
- H_3BO_3 : 0,01mg
- $Ca\ Cl_2$: 0,01mg
- $(NH_4)_2SO_4$: 0,72mg
- Glucose : 5 g
- Extrait de levure : 3,5 g
- Eau distillée : 1 l
- pH : 7

Dans les expériences sur les Arthrobacter on a utilisé uniquement les cultures en milieu liquide.

PREMIERE PARTIE

ETUDE DE QUELQUES ECOSYSTEMES AQUATIQUES ET COMPARAISON DE DEUX BIOTOPES

xxxxxxxxxxxxxxx

Dans cette partie sont rassemblés les résultats des travaux effectués sur le terrain. Il s'agit principalement de mesures physiques, chimiques et microbiologiques dans l'eau et la vase de divers lacs, rivières et étangs.

I - LES VASES DE QUELQUES ECOSYSTEMES AQUATIQUES

L'étude d'ensemble réalisée sur une période de plusieurs mois (Octobre à Décembre) a porté sur les biotopes suivants : Lac de Nantua, Rivière La Noye, la Poix, la Somme, Etang du Paraclet auxquels on a ajouté une terre de jardin à titre de comparaison avec un sol.

A - CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES

Comme on le voit sur le tableau II, le pH est partout assez voisin de la neutralité.

	pH	C ORGANIQUE o/oo.		N TOTAL o/oo.		ACIDES HUMIQUES o/oo		RAPPORT C/N	TENEUR EN EAU = T par rapport au poids des
		o/oo		o/oo		o/oo			
		vase sèche	vase humide	vase sèche	vase humide	vase sèche	vase humide		
ac de Nantua	6,7	22	7,3	2,9	0,97	0,2	0,07	7,5	196
tang du Paraclet	6,8	90	21	11,2	2,6	13,8	3,24	8	393
[illegible] Lemme	6,9	50,2	11,6	8,9	2,1	1,8	0,41	5,5	333
[illegible] Poix	6,3	45,5	11,8	7,3	1,9	1,5	0,39	6,2	286
[illegible] Noye	7,1	61	16	8,05	2,13	2	0,53	7,5	276
erre témoin	7,2	27	21,6	2,9	2,4	1,85	1,5	9	26

TABLEAU II - Caractéristiques physico-chimiques des vases de différents étangs comparées à celles de la terre témoin (Institut Pasteur).

Pour ce qui est du carbone, de l'azote total et des acides humiques, on observe trois groupes dans les cinq vases étudiées :

- Le lac de Nantua pauvre en carbone organique ;
- La Noye et l'étang du Paraclet, très proches l'un de l'autre, sont riches en carbone organique avec une valeur forte pour l'étang ;
- La Somme et la Poix sont à peu près semblables du point de vue du carbone, mais la Somme riche en azote a un rapport C/N bas.

Sur les teneurs en eau, on observe la faiblesse prévisible du chiffre trouvé pour la terre de jardin par rapport aux vases où l'eau, dans l'étang et la Somme, représente plus de trois fois le poids de matière sèche.

B - LES GRANDS CYCLES BIOLOGIQUES DANS LES VASES

L'étude des cycles biologiques est indispensable pour préciser et compléter les résultats des analyses physico-chimiques.

1) Carbone

On a ajouté la numération de la microflore totale dans le tableau III où sont présentés les groupes physiologiques du cycle du carbone :

a) Microflore totale

Dans l'ensemble, on trouve deux groupes : la Poix et la Somme sont d'une grande richesse en germes ; leur nombre est égal ou supérieur à celui de la terre de jardin. Les vases du deuxième groupe (lac de Nantua, Etang du Paraclet, la Noye) ont une teneur en germes moyenne ou faible.

	MICROFLORE TOTALE 10^6 germes / g vase humide	AMYLOLYSE 10^6 germes/g de vase humide	CELLULOLYSE ANAEROBIE : germes / g de vase humide	LIPIDOLYSE 10^6 germes/g de vase humide Compt. Colonies	PECTINOLYSE 10^3 germes/g vase humide	
					Aérobie	Anaérobie
Lac de Nantua	9,5	4,5	6	0,5	2,5	2,5
Etang du Paraclet	15	10	0	2	60	6
La Somme	250	9,5	60	10	50	6
La Poix	450	250	6.000 pigment.	65	250	24
La Noye	15	10	6	0,8	2,5	25
Terre témoin	250	25	6.000 pigment.	7,5	130	25

TABLEAU III - Dénombrement de la microflore totale et des germes intervenant dans le cycle du carbone dans les vases.

b) Amylolyse

Cette fonction reflète a peu près ce qui se passe pour la microflore totale, sauf pour la terre de jardin et la Somme, dont le nombre d'amylolytiques est relativement moyen comparé à leur microflore totale très riche. L'évolution de l'amylolyse en fonction du temps (fig.6) montre, d'abord, que ce substrat est rapidement dégradé. On assiste à une évolution rapide pendant les cinq premiers jours, puis à un palier brusque pour la Poix (1), la terre de jardin (2), la Somme (3), la Noye (5) l'étang du Paraclet (6) ; Nantua (4) présente, par contre, une évolution lente, croît sans arrêt pour finir au même niveau que (2), (3), (5) et (6), alors que la Poix est nettement plus riche.

c) Cellulolyse anaérobie

Existe en faible quantité ou pas du tout dans les trois vases pauvres : en quantité moyenne dans la vase de la Poix et la terre de jardin. Il s'agit, alors, de germes pigmentés en jaune orangé.

d) Pectinolyse

Les résultats sont très divers en ce qui concerne la répartition entre aérobies et anaérobies. Pour les vases, il s'agit, le plus souvent, de bactéries anaérobies strictes, non pigmentées. Pour la terre de jardin, la flore pectinolytique est plus variée.

e) Lipidolyse

Reflète à peu près la microflore totale.

2) Azote

Les dénombrements des groupes physiologiques du cycle de l'azote sont rassemblés dans le tableau IV.

a) Nitrification

La présence des nitrificateurs est générale, le nombre de germes nitreux étant beaucoup plus important dans les vases que le nombre de germes nitriques.

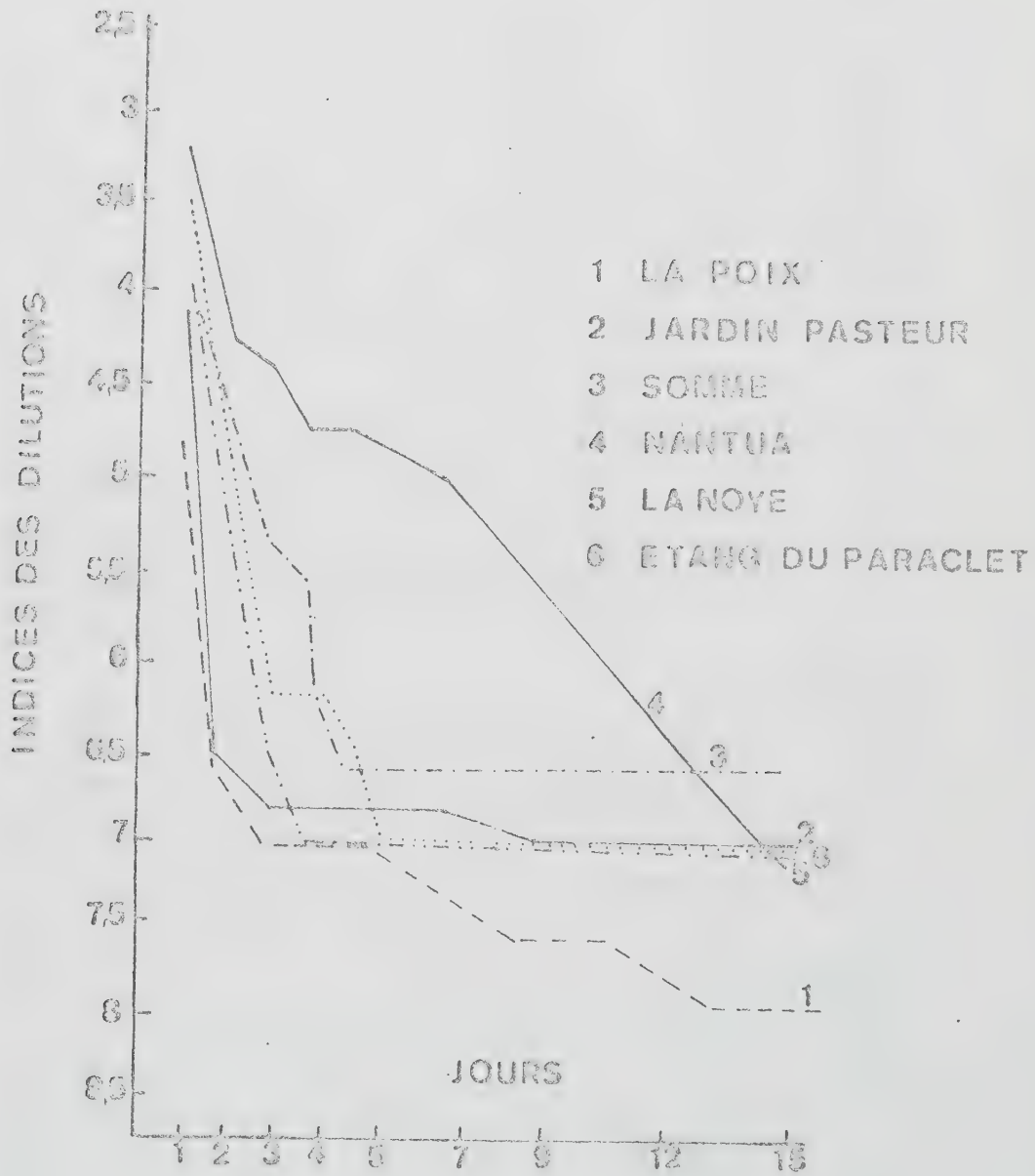


Fig. 6 - Courbe d'activité amylolytique dans les 5 vases et la terre témoin (Jardin Pasteur).

	NITRIFICATION 10^3 germes/g de vase humide		DENITRIFICATION 10^6 germes/g de vase humide	PROTEOLYSE 10^6 germes/g de vase humide	AMMONIFICATION 10^6 germes / g de vase humide	FIXATION ANAEROBIE N_2 10^3 germes/g de vase humide
	Nitrosation	Nitratation				
ac de Nantua	45	0,25	0,01	0,95	4,5	2,5
tang du Paraclet	25	1,5	0,075	9,5	15	95
a Mape	2,5	0,25	0,01	2,5	15	2,5
Somme	15	9,5	9,5	9,5	250	75
Foix	450	25	4,5	140	250	45
erre témoin	20	25	0,015	15	40	40

TABLEAU IV - Dénombrement des germes intervenant dans le cycle de l'azote.

b) Dénitrification

Il nous a été impossible de tracer une courbe d'activité pour cette fonction, l'irrégularité étant grande pendant les premiers jours de culture. Après 21 jours d'incubation, la situation se clarifie cependant et les lectures deviennent possibles. L'irrégularité constatée est peut-être due à la répartition du milieu en anaérobiose.

c) Protéolyse

Pour tous les échantillons, les nombres sont élevés et suivent, à peu près, les variations de la microflore totale. La figure (7) montre, les 5 premiers jours, une évolution rapide et un palier qui s'installe progressivement.

d) Ammonification

Suit presque fidèlement les variations de la microflore totale. Les cinq premiers jours (fig.8) on distingue deux groupes d'échantillons : la Poix (1), la terre de jardin (2) et la Somme (3) évoluent plus rapidement que Nantua (4), le Paraclet (5) et la Noye (6) ; puis la vitesse d'évolution devient sensiblement constante.

e) Fixation anaérobie

La fixation se fait partout à des taux plus ou moins élevés. La vase du Paraclet, qui se range d'ordinaire dans le groupe peu actif, en contient le plus grand nombre.

3) Soufre

Les groupes physiologiques du cycle du soufre et les dénombremen des bactéries photosynthétiques sont présentés dans le tableau V.

a) Sulfatoréduction

La vase de la Poix se révèle extrêmement active. Les autres chiffres sont très variables et ne s'alignent pas du tout sur la microflore totale.

La terre de jardin renferme un chiffre appréciable de ces anaérobies, malgré une texture bien aérée.

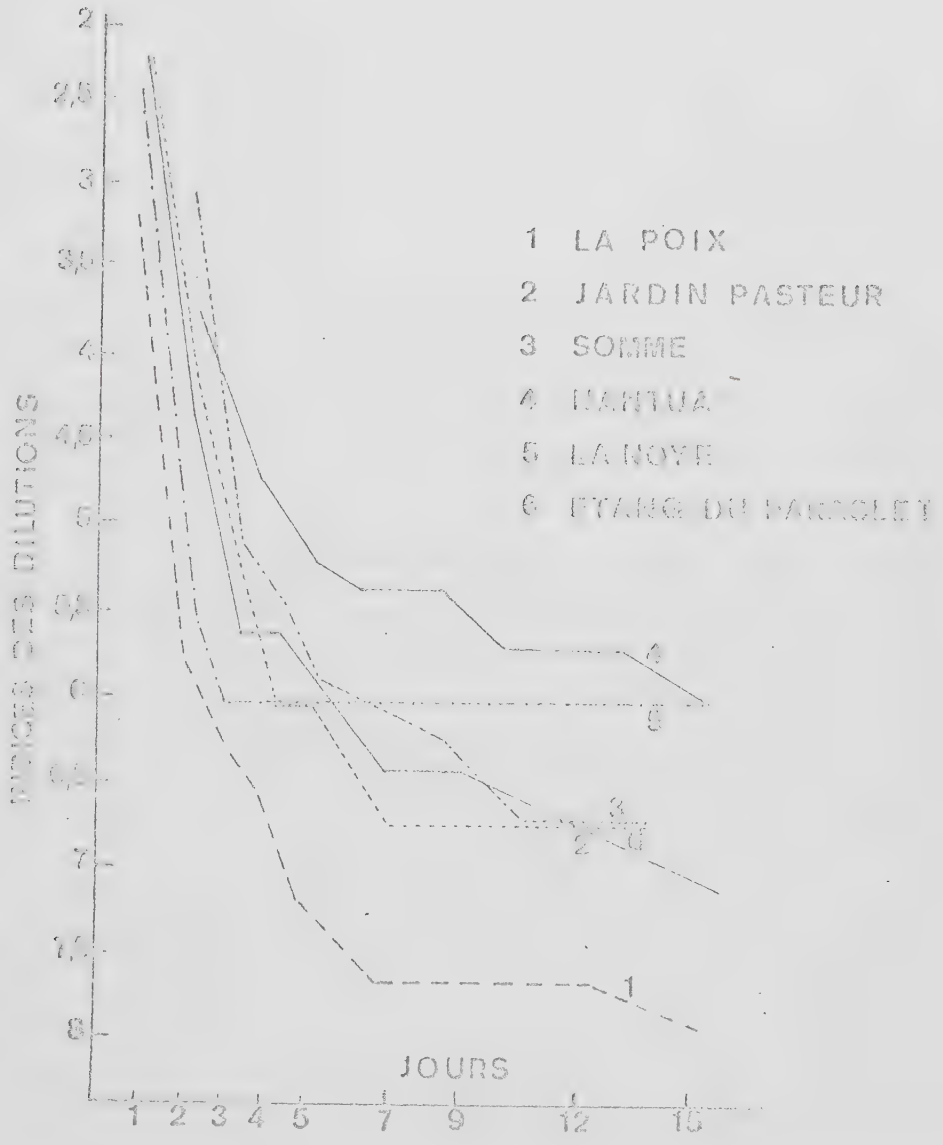


Fig. 7 - Courbe d'activité protéolytique dans les 5 vases et la terre témoin (Jardin Pasteur).

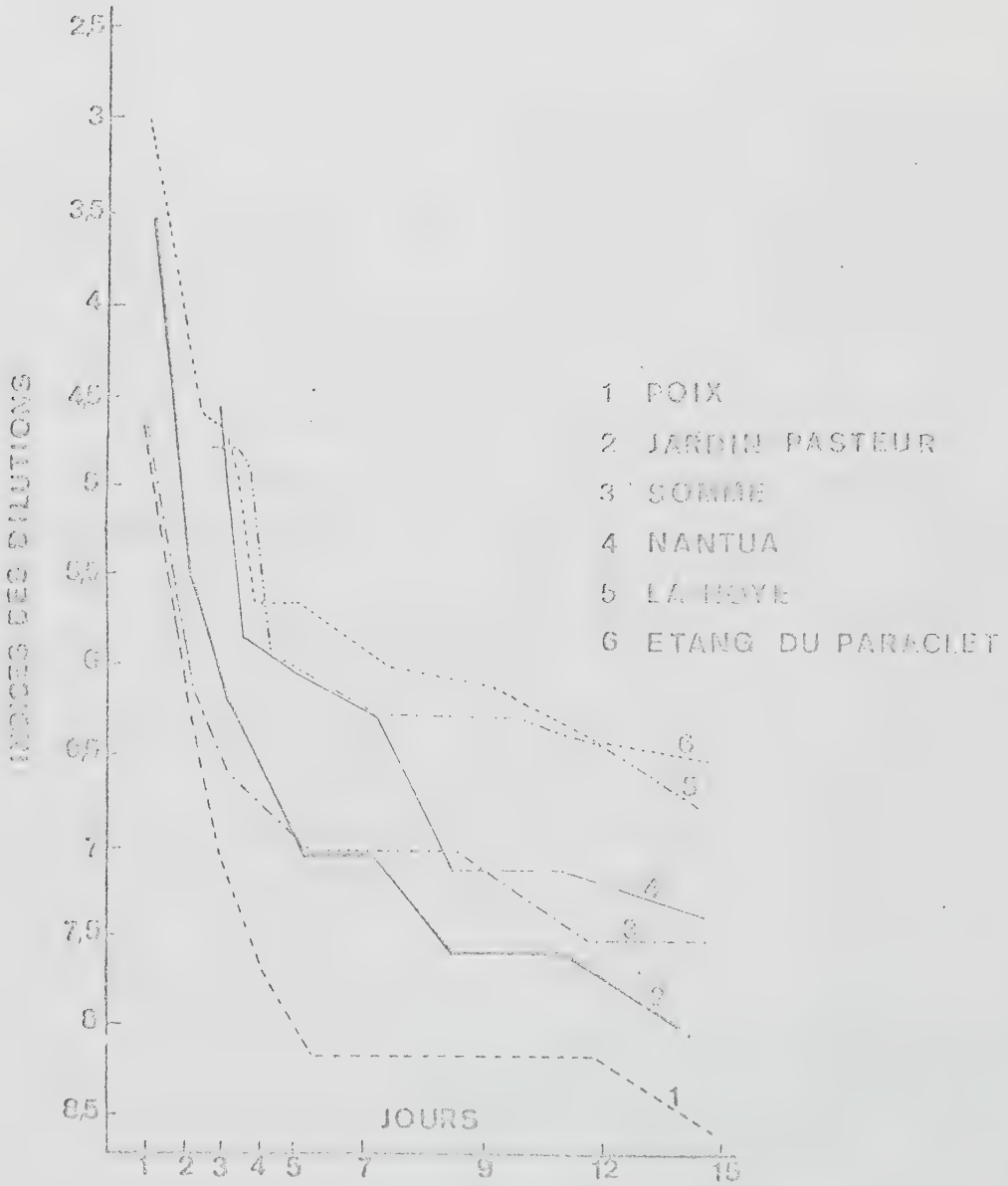


Fig. 8 - Courbe d'activité ammonifiante dans les 5 vases et la terre témoin (Jardin Pasteur).

	SULFATO-REDUCTION 10^3 germes /g de vase humide	MINERALISATION DU SOUFRE ORGANIQUE 10^3 germes/g de vase humide	SULFOXYDATION germes/g de vase humide	PHOTOSYNTHESE	
				Thiorodacées germes/g de vase humide	Athiorodacées 10^3 germes/g de vase humide
de Nantua	25	0,45	0	0	2,5
g du Paraclet	450	1,5	18	0	250
Somme	0,45	250	50	25	95
Foix	4.500	450	18	7	250
Noye	0,25	0,25	50	0	9,5
e témoin	25	20	8	0	0

TABLEAU V - Dénombrement des germes intervenant dans le cycle du soufre et la photosynthèse.

b) Minéralisation anaérobie du soufre organique

Nous avons encore une séparation en deux groupes. Trois échantillons riches et trois échantillons pauvres. Ces germes, appelés bactéries de la putréfaction, dégagent de l'hydrogène sulfuré à partir de matières organiques soufrées. Dans la Somme, ce sont eux surtout qui produisent l'H_2S, puisque les sulfatoréducteurs s'y trouvent en petit nombre. Pour la Poix, au contraire, la production d'H_2S due à ces germes s'ajoute à celle des sulfatoréducteurs déjà très nombreux.

c) Sulfoxydation

Cette fonction étant considérée comme parallèle à celle de la nitrification, nous avons été surpris de constater l'absence ou la très faible quantité de ces germes. En effet, la plupart des auteurs qui étudient les vases en ont trouvé des quantités appréciables, même sous quelques mètres de sédiments (MAKHTIEVA, 1963). Ils recherchaient, cependant, l'oxydation des thiosulfates et non celle de l'H_2S. Ce serait une nécessité d'approfondir les différentes techniques de culture dans un travail ultérieur.

d) Photosynthèse

Les Athiorhodaceae se sont très bien développés dans le milieu décrit et souvent en grand nombre ; mais la terre de jardin n'en contient pas, ces bactéries sont spécifiquement des germes de vases. Il est peu probable que ces germes fassent de la photosynthèse à l'intérieur de la vase où la lumière ne pénètre pas. Ils croissent, sans doute, de manière hétérotrophe en dégradant diverses substances carbonées et azotées du métabolisme intermédiaire.

Les Thiorhodaceae sont présentes dans la Somme (vertes) et dans la Poix (rouges), mais en petite quantité. Le milieu de culture utilisé ne semble, toutefois, pas leur convenir, car leur développement reste toujours très faible. Etant des photosynthètiques strict, ces germes ne peuvent que se maintenir au sein de la vase et non se multiplier activement

Lors d'une expérience ultérieure, nous avons mis quelques grammes de chaque vase dans une colonne de boue type Schlegel et Pfenning (1961). Dans ces conditions, toutes les vases ont donné lieu à un développement de bactéries photosynthétiques exigeant H_2S :

- La Poix : surtout de petits Chromatium et quelques Chlorobac teriaceae ;
- La Somme : surtout des Chlorobacteriaceae, quelques Thiorhodaceae ;
- Nantua : uniquement des Chlorobacteriaceae. Le Paraclet et la Noye : un mélange de bactéries rouges et vertes.

C - DISCUSSION DES RESULTATS

1) Enrichissement des milieux ; répartition spéciale pour l'anaérobiose.

L'incorporation de petites quantités de peptone aux milieux qui le permettent (numération globale, protéolyse, ammonification, amylolyse), ne gêne en rien la croissance des bactéries spécifiques. Les chiffres (comparés aux résultats d'autres auteurs) seraient plutôt en faveur d'une lègère augmentation du nombre de germes et d'une accélération des courbes d'activité biologique pendant le premier et le deuxième jour de culture. D'autre part, la répartition spéciale des même milieux en anaérobiose (9 ml en tubes de 14 mm) permet la croissance simultanée des aérobies et des anaérobies. Pour la vase de la Somme, toutefois, les réactions positives de l'ammonification à la dilution 10-8 sont dues uniquement à des anaérobies : le trouble microbien débute au fond du tube, s'y maintient et la production d'ammoniaque n'est positive qu'à cet endroit.

Cette dernière observations justifie l'emploi de milieux enrichis répartis pour l'anaérobiose; mais, compte tenu de la première remarque, il semble que des milieux classiques répartis en aérobiose suffisent pour apprécier couramment l'activité microbiologique des vases.

2) Comparaison des différentes vases

Par leur aspect, leurs données organo-chimiques et bactériologiques, les 5 vases étudiées peuvent être réunies en 3 groupes. La vase du Lac de Nantua reste à part. Malgré sa pauvreté en matière organique et spécialement en humus, elle possède une relative richesse en micro-organismes. Ce sédiment est équilibré, car tous les groupements sont représentés et surtout celui de la nitrosation qui va de pair avec une ammonification assez active. Les sulfatoréducteurs sont actifs, cela explique la couleur noire de la vase. Les courbes (fig. 6, 7 et 8) montrent une activité générale ralentie par rapport aux autres vases.

Les sédiments de l'étang du Paraclet et de la Noye sont très proches, géographiquement et par leur aspect, leur teneur en carbone et en azote organique. Ils diffèrent essentiellement par leur teneur en humus, élevée au Paraclet, faible dans la Noye. Cette différence ne paraît guère influencer l'activité biologique en général. La pente des courbes, ainsi que le nombre de micro-organismes totaux sont voisins. La forte teneur en humus du Paraclet semble, toutefois, activer certaines fonctions les nitrificateurs sont dix fois plus nombreux, les fixateurs quarante fois plus, les Athiorhodaceae vingt-cinq fois plus, les sulfatoréducteurs deux mille fois plus. La teneur très élevée en sulfatoréducteurs ne rend la vase ni noire, ni nauséabonde. Bien que moins active pour ces groupements particuliers, la vase de la Noye est mieux équilibrée : les germes sont également répartis dans toutes les fonctions ; on peut la comparer à une terre de grande culture appauvrie.

La vase de l'étang révèle un certain déséquilibre puisque quelques fonctions se trouvent accélérées et d'autres ralenties : les cellulolytiques, par exemple, manquent. Cette absence favorise l'envasement rapide de l'étang et expliquerait, en partie, la formation de tourbe observée dans la région.

Les vases de la Somme et de la Poix constituent un troisième groupe bien différent des trois autres prélèvements. Polluées chimiquement de manière continue, ces vases noires et putrides renferment très peu

d'humus, moins d'azote et de carbone organique et le rapport C/N est le plus bas. Malgré cette apparente pauvreté, la croissance bactérienne globale est multipliée par 15 à 30 par rapport à la Noye ou au Paraclet. Il apparaît donc, que la qualité des substances organiques disponibles est beaucoup plus importante que leur quantité pour la stimulation de la population microbienne. Les vases de la Somme et de la Poix ressemblent davantage à une installation pour la culture continue des bactéries, qu'à un sol : les substances nutritives y sont apportées continuellement sous forme de déchets alimentaires facilement assimilables tels que peptones et graisses (laiterie de la Poix). Toutefois, il ne s'agit pas ici de culture continue d'une souche pure, mais de l'entretien de tous les groupements physiologiques habituels au sol. Nous ne constatons aucun déséquilibre, ce qui favorise une autoépuration progressive au fur et à mesure que l'on s'éloigne du point de déversement. L'arrivée ininterrompue d'azote complexe, facilement assimilable, ne freine nullement l'activité des germes autotrophes : nitrificateurs, fixateurs et sulfatoréducteurs abondent et se multiplient d'emblée sur les milieux minéraux pauvres.

La Somme diffère de la Poix par une activité globale plus faible, accentuée par l'amylolyse et protéolyse, et surtout par le petit nombre de sulfatoréducteurs. Les anaérobies stricts ou préférentiels ont, dans les deux sédiments, particulièrement dans la Poix, une activité considérable et prépondérante. Nous avons déjà souligné le grand nombre de sulfatoréducteurs, de putréfiants et de dénitrifiants. On pourrait penser a priori que l'anaérobiose dominante et le dégagement important d'hydrogène sulfuré (en général toxique pour la plupart des bactéries) inhibent les divers groupements physiologiques. Or, l'observation prouve qu'il n'en est rien. Non seulement tous les groupes physiologiques sont actifs, mais les germes aérobies stricts, comme les nitrificateurs, sont fortement stimulés. La présence simultanée de sulfatoréducteurs et de nitrifiants est surtout mise en évidence dans la Poix.

D - CONCLUSION : Tentative de mise en évidence des caractères communs.

Mises à part la cellulolyse et la sulfoxydation, tous les groupements se révèlent très actifs dans ces sédiments. Les fonctions ci-dessous

suivent à peu près les variations de la microflore totale : amylolyse, lipidolyse, pectinolyse, protéolyse et ammonification. Selon l'activité globale, on peut établir grossièrement deux groupes : les sédiments comprenant 9-15 millions de germes par gramme (Nantua, la Noye, le Paraclet puis les sédiments "pollués" et la terre de jardin, extrêmement actifs, contenant de 250 à 450 millions de germes. L'activité microbiologique ralentie de la vase de Nantua correspond à son faible taux en matière organique. Les vases "polluées" de la Poix et de la Somme ont une teneur en matières organiques moindre que celles de la Noye et du Paraclet ; elles montrent cependant une activité microbiologique quinze à trente fois plus élevée. Les deux vases "polluées" ont une microflore anaérobie prédominante (très grand nombre de sulfatoréducteurs, putréfiants, dénitrifiants), mais contiennent simultanément des groupements aérobies (nitrificateurs) fort actifs. MAKHTIEVA avait déjà constaté ce dualisme dans le lac Bol'shoi ; elle l'explique par l'existence de micro-zones aérobies au sein de substrat anaérobie. Ces micro-zones seraient produites par la pénétration, dans la masse de la vase, d'air et de composés oxydés provenant de l'eau et de la surface de la vase. Cette hypothèse n'est toutefois pas entièrement satisfaisante, surtout lorsqu'on se trouve en présence de sédiments prélevés sous 38 mètres d'eau (Nantua) ou sous plusieurs mètres de vase (MAKHTIEVA, lac Bol'shoi). Peut-être les nitrificateurs autotrophes sont-ils micro-aérophiles dans leur substrat naturel et aérobies stricts dans les milieux de culture : c'est un fait bien connu pour les Azotobacter.

D'autre part, les milieux de cultures utilisés, bien que très pauvres, ne garantissent pas la croissance seule des nitrificateurs autotrophes. Ils permettaient la culture d'autres bactéries nitrifiantes, par exemple des hétérophes peu exigeants mais microaérophiles.

Il a semblé nécessaire de reprendre expérimentalement la question de la nitrification dans son ensemble, comme l'ont également recommandé GENEVOSE, MACRI et SCAVUZZO (1966).

Dans ce travail de prospection microbiologique des vases, nous avons pu montrer que les pollutions organiques en rivière entraînent des modifications importantes de la microflore.

Il semble, par contre, que les lacs et étangs se présentent comme des milieux relativement équilibrés. Ce fait nous a conduit à poursuivre notre étude sur les étangs. D'autre part, les questions soulevées par la nitrification nous ont amenés à porter une attention particulière au cycle de l'azote dans la suite de notre travail, à la fois sur le terrain et au laboratoire.

II - ETUDE COMPARATIVE DE DEUX BIOTOPES :

Etangs de la Rouillie et de Soustons

Au vu des résultats de l'étude précédente, nous avons axé notre travail sur deux étangs non pollués, situés sur des substrats différents et dans des régions de climat différent : étang de la Rouillie (département de l'Oise), étang de Soustons (département des Landes). Les mesures physico-chimiques et microbiologiques, dont le détail est précisé dans la partie "Matériel et Méthodes", ont été effectuées mensuellement au cours de l'année 1969 dans l'étang de la Rouillie ; ce rythme semblant faible, l'étang de Soustons a fait l'objet de mesures bimensuelles au cours de l'année 1970. A la suite de l'examen des données brutes, on a présenté une étude mathématique de ces données destinée à montrer les renseignements complémentaires qu'on peut en tirer.

A - EXAMEN CRITIQUE DES DONNEES BRUTES

Les différentes mesures effectuées sont rassemblées dans des tableaux. On a également porté sur des graphiques :

- les chiffres obtenus pour les résultats physico-chimiques en fonction du temps, en coordonnées normales ;

- les nombres de bactéries des divers groupes physiologiques en fonction du temps, en coordonnées semi-logarithmiques.

1) Etang de la Rouillie

- La vase

L'ensemble des données chimiques et microbiologiques concernant la vase de l'étang de la Rouillie est inscrit sur le tableau VI traduit par les figures 9 et 10 pour la chimie, et 11 pour les données microbiologiqu

La figure 9 montre une concordance assez nette entre l'évolution du carbone et de la matière organique avec une chute brutale au mois de Juin. Pour l'azote total, la baisse de Juin est très peu accentuée, mais on note une remontée en Novembre alors que C et M.O. sont en diminution.

La figure 10 met en évidence un maximum hivernal de NH_4^+ et NO_3^- suivie d'une baisse assez rapide ; ensuite, la teneur en NH_4^+ et NO_3^- reste à peu près constante avec un léger relèvement en automne.

La température montre un maximum net en Août qui correspond à un maximum de l'ammonification, visible sur la figure 11. Sur cette figure, on remarque les variations en dents de scie des divers groupes physiologiques étudiés où, dans tous les cas, on observe un minimum hivernal.

Il semble donc ici qu'il y ait une concordance entre la température et l'ammonification et une opposition entre ces deux dernières variables et la teneur en NH_4^+.

- L'eau

Les données sur l'eau de l'étang sont rassemblées sur le tableau VII traduit par la figure 12 en ce qui concerne la chimie et la figure 13 pour ce qui est du nombre de bactéries ammonifiantes. On constate que les nitrates ont une évolution différente de l'azote ammoniacal et sont en quantité beaucoup plus faible, alors que dans la vase, les deux variables semblaient plus proches l'une de l'autre.

DATE DE PRELEVEMENT	12-64	1 -65	2 - 65	3 - 65	4 - 65	5 - 65	6 - 65	7 - 65	8 - 65	9 - 65	10-65	11-65
Température en degrés C	7,1	2,3	5,2	8,3	14	15,2	18,5	21	23,5	19	12	8,2
Matière organique en % de matière sèche	29,30	29,50	29,10	29	29,20	28,22	27	30	30,12	30,20	29,60	28,80
Carbone en mg par kg de M.S.	60.500	59.000	57.500	59.200	58.500	54.300	44.500	57.800	60.200	61.300	57.800	53.90
Azote en mg par kg de M.S.	7.050	6.500	5.350	5.220	4.850	5.177	4.810	4.620	5.100	4.930	5.650	6.80
NH_4^+ en mg d'azote par kg de M.S.	270	110	80	72	59	67	62	55	72	70	90	130
NO_3^- en mg d'azote par kg de M.S.	280	60	46	38	32	27	25	17	48	35	60	75
Nombre de germes ammonifiants en millions par g de vase humide	3	3,5	3,5	35	2,5	35	2,5	25	35	25	65	35
Nombre de germes nitrifiants par g de vase humide	25	2	14	0	100	34	250	2	10	3,5	350	34
Nombre de germes dénitrifiants par g de vase humide	2.500	3.000	35.000	140.000	35.000	3.500	25.000	5.000	14.000	7.000	250.000	25.00
Nombre de germes fixateurs d'azote par g de vase humide	350	140	350	140	4.500	350	7.000	350	450	4.500	7.000	4.50

Tableau VI - Vase de l'étang de la Rouillie - Données physico-chimiques et microbiologiques.

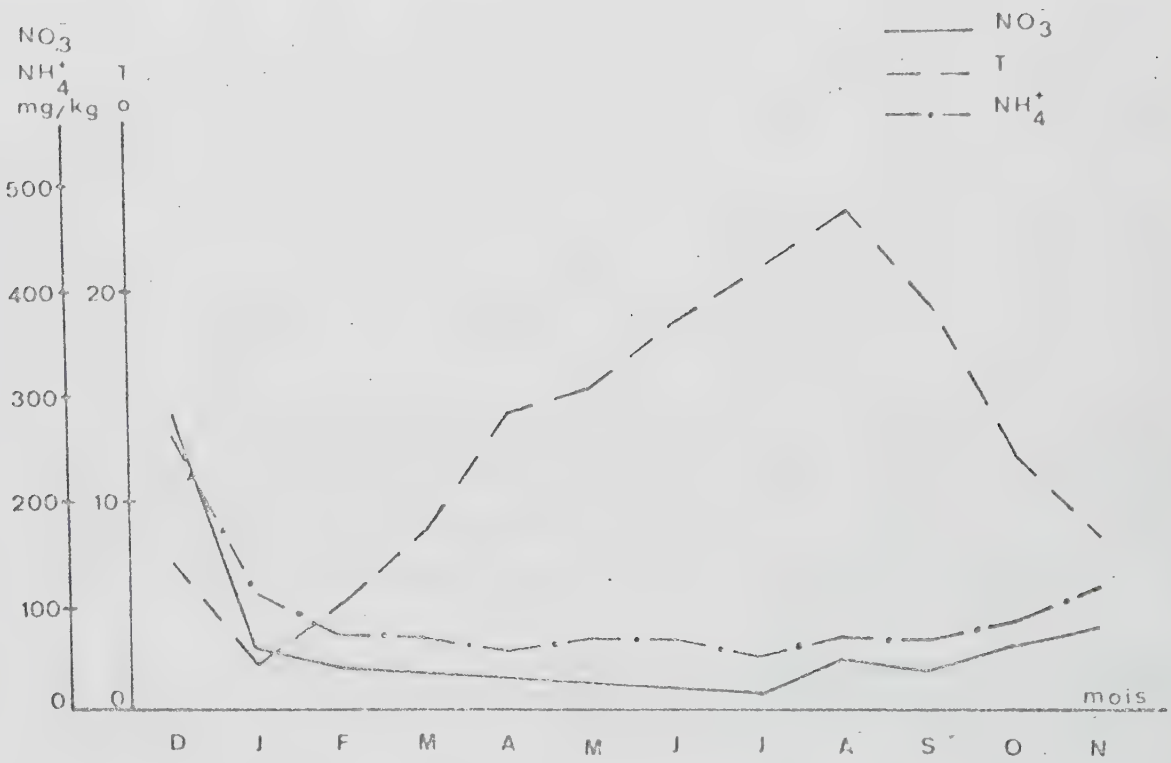


Fig. 9 - Vase de la Rouillie : température, N NH_4^+, N NO_3^- en mg d'azote par kg de matière sèche.

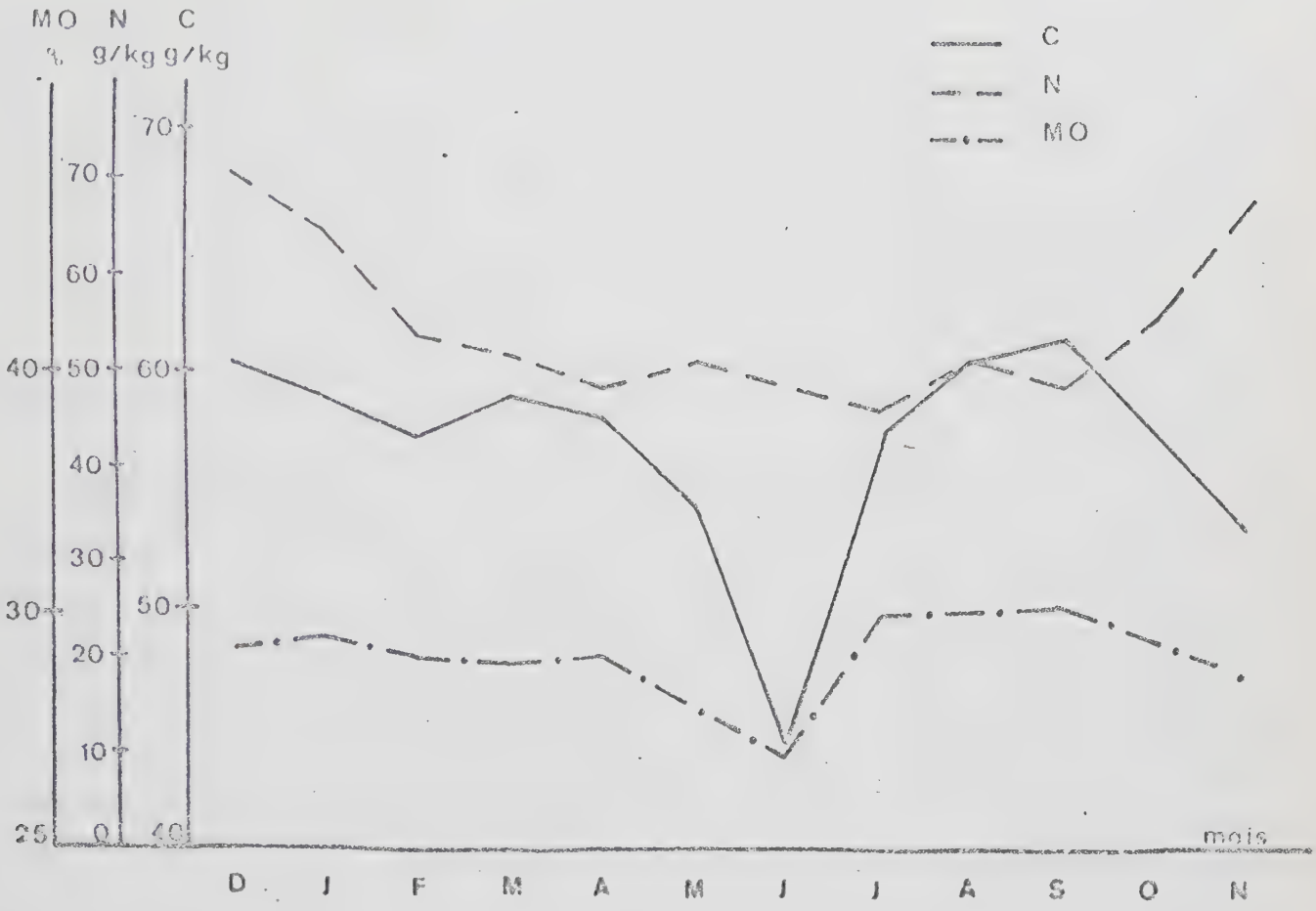
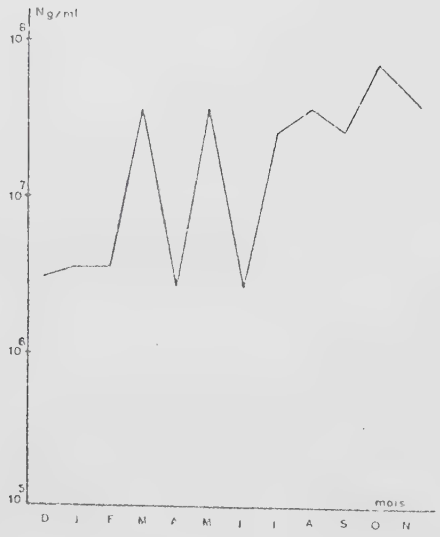
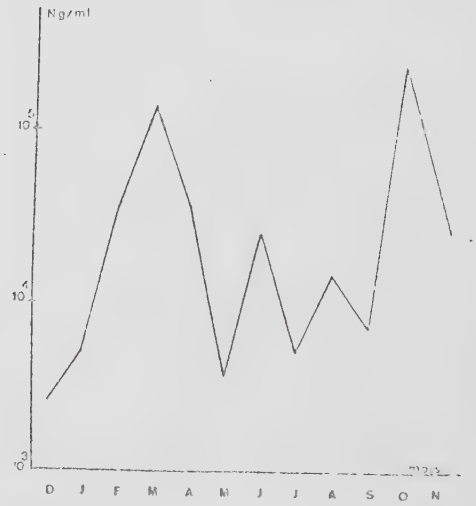


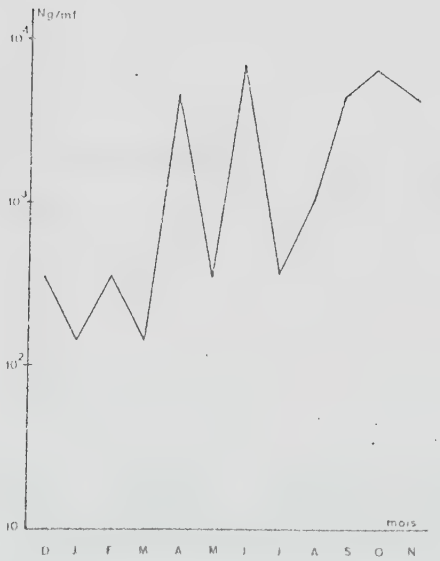
Fig. 10 - Vase de la Rouillie : carbone organique, azote total en g/kg de matière sèche et matière organique en % de matière sèche.



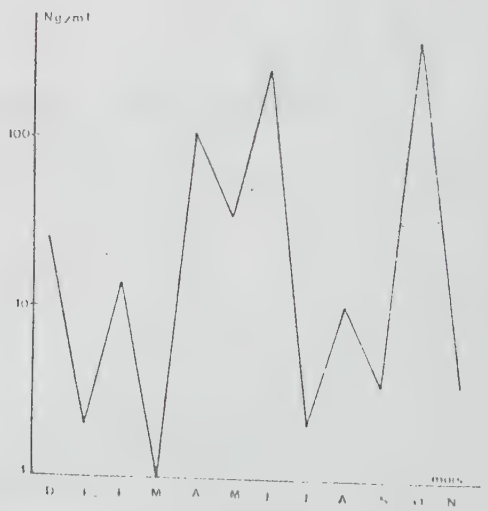
Ammonification



Dénitrification



Fixation anaérobie



Cellulolyse

Fig.11 - Vase de la Rouillie : Groupes physiologiques - en ordonnée les logarithmes des nombres de germes par g de vase - en abscisse, les mois de l'année.

DATE DU PRELEVEMENT	12-64	1 - 65	2 - 65	3 - 65	4 - 65	5 - 65	6 - 65	7 - 65	8 - 65	9 - 65	10-65	11 - 6
Température en degrés C	7,1	3,9	5,2	8,3	14	15,2	8,3	21	21,6	16,1	12	9,3
O_2 en pourcentage de saturation.	95	105	115	105	110	120	115	80	60	85	110	98
NH_4^+ en mg d'azote par l eau	0,98	0,85	0,80	0,77	0,54	0,15	0,12	0,09	0,25	0,38	0,42	0,72
NO_3^- en mg d'azote par l eau	0	0,06	0,12	0,09	0,03	0,08	0,07	0,02	0,04	0,09	0,11	0,06
Nombre de germes ammonifiants par ml d'eau	35.000	25.000	35.000	18.000	13.000	50.000	730000	250.000	350.000	50.000	13.000	25.000

Tableau VII - Eau de l'étang de la Rouillie - Données physico-chimiques et microbiologiques.

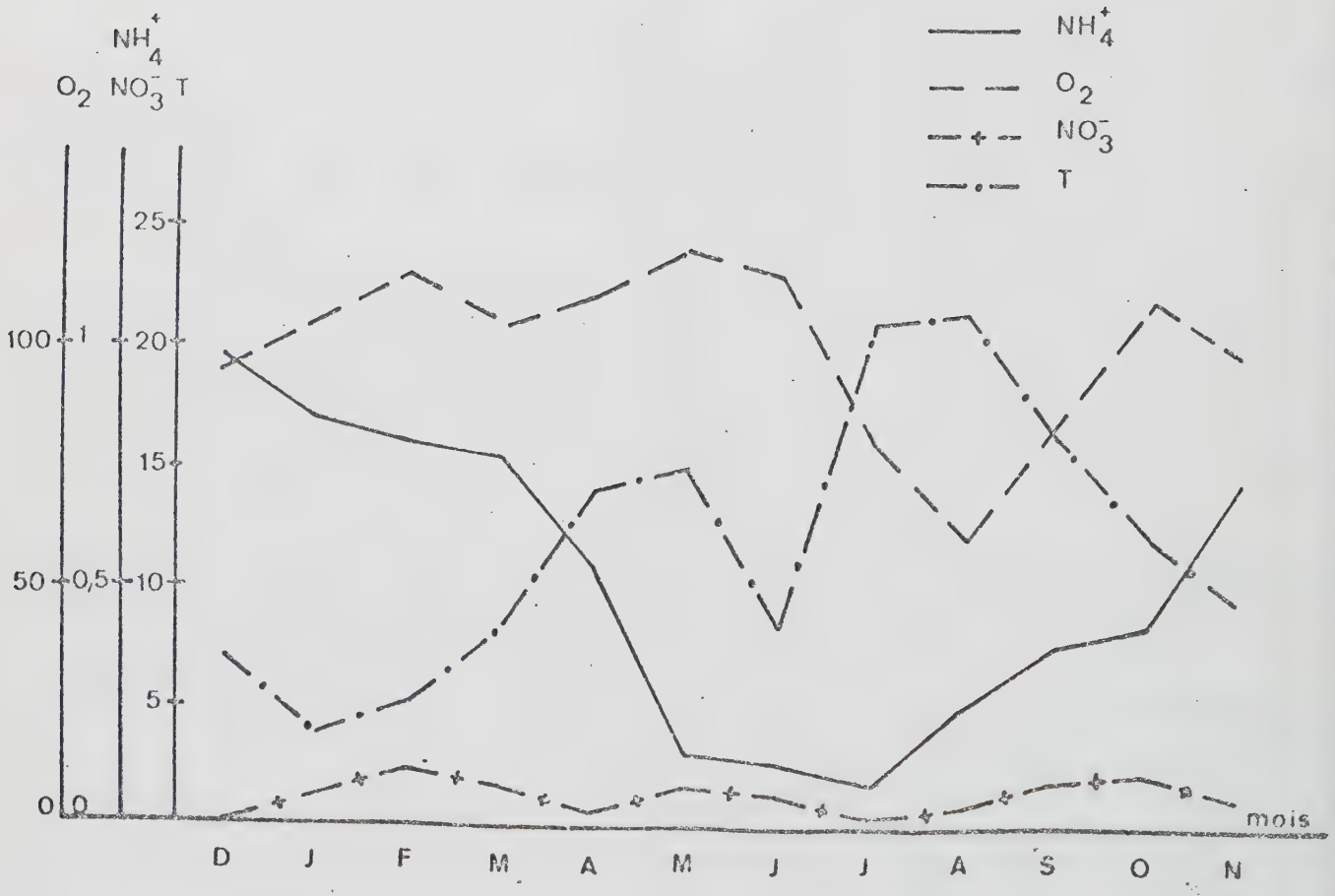


Fig. 12 - Eau de la Rouillie : Oxygène en pourcentage de saturation, température, N NH_4^+ et N NO_3^- en mg d'azote par 1 d'eau.

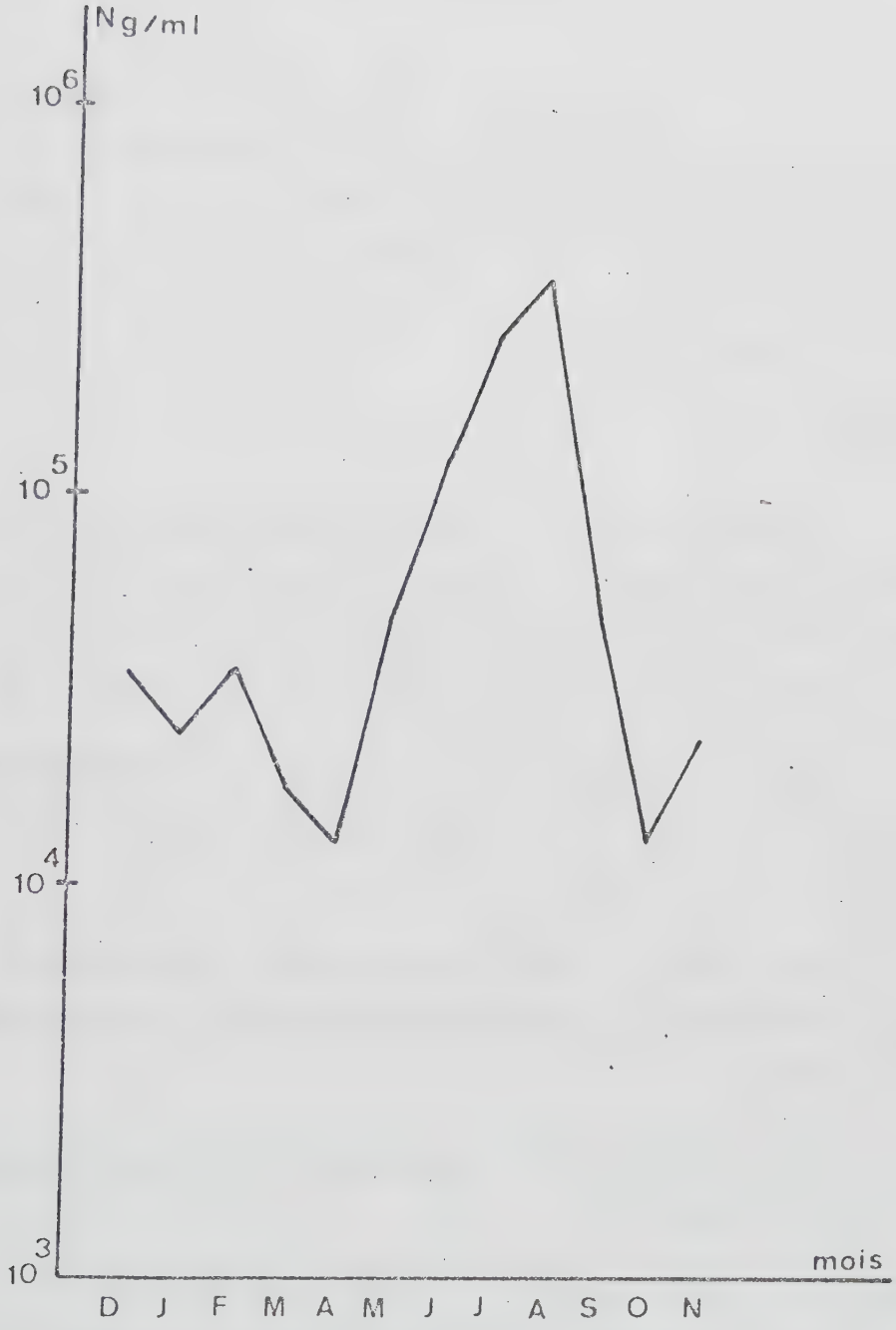


Fig. 13 - Eau de la Rouillie : En ordonnée, logarithme du nombre de germes ammonifiants par ml d'eau -- en abscisse, les mois de l'année.

On note également, mais cette fois d'une manière plus nette que dans la vase, la concordance entre les maximas et minimas de la température et du nombre de germes ammonifiants et le phénomène inverse pour la teneur en azote ammoniacal.

On voit donc apparaître dans l'étang de la Rouillie, dans l'eau comme dans la vase, l'opposition entre la température et la microflore ammonifiante avec la teneur en azote ammoniacal. Pour le reste, il n'est guère possible de tirer des conclusions.

2) Etang de Soustons

- La vase

Le tableau VIII est traduit par les figures 14 et 15, en ce qui concerne respectivement la chimie et la microbiologie. La figure 14 nous indique d'emblée un maximum hivernal et un minimum estival pour l'azote ammoniacal. Nous retrouvons ici ce que nous avons vu plus haut.

Les variations de l'azote nitrique sont difficilement explicables d'autant que le nombre de germes nitrifiants a desvariations en dents de scie (fig. 15).

Par contre, l'ammonification montre assez nettement un maximum en Août, donc en été, et un minimum hivernal qui correspondent aux extrêmes de la température.

Les variations de l'organoréduction suivent également en gros celles de la température.

- L'eau

Sur la figure 16 traduisant les résultats des analyses chimiques et des mesures de température portées sur le tableau IX, on observe la faiblesse générale du taux des nitrites ; il est connu classiquement que dans les milieux naturels, les nitrites sont très instables.

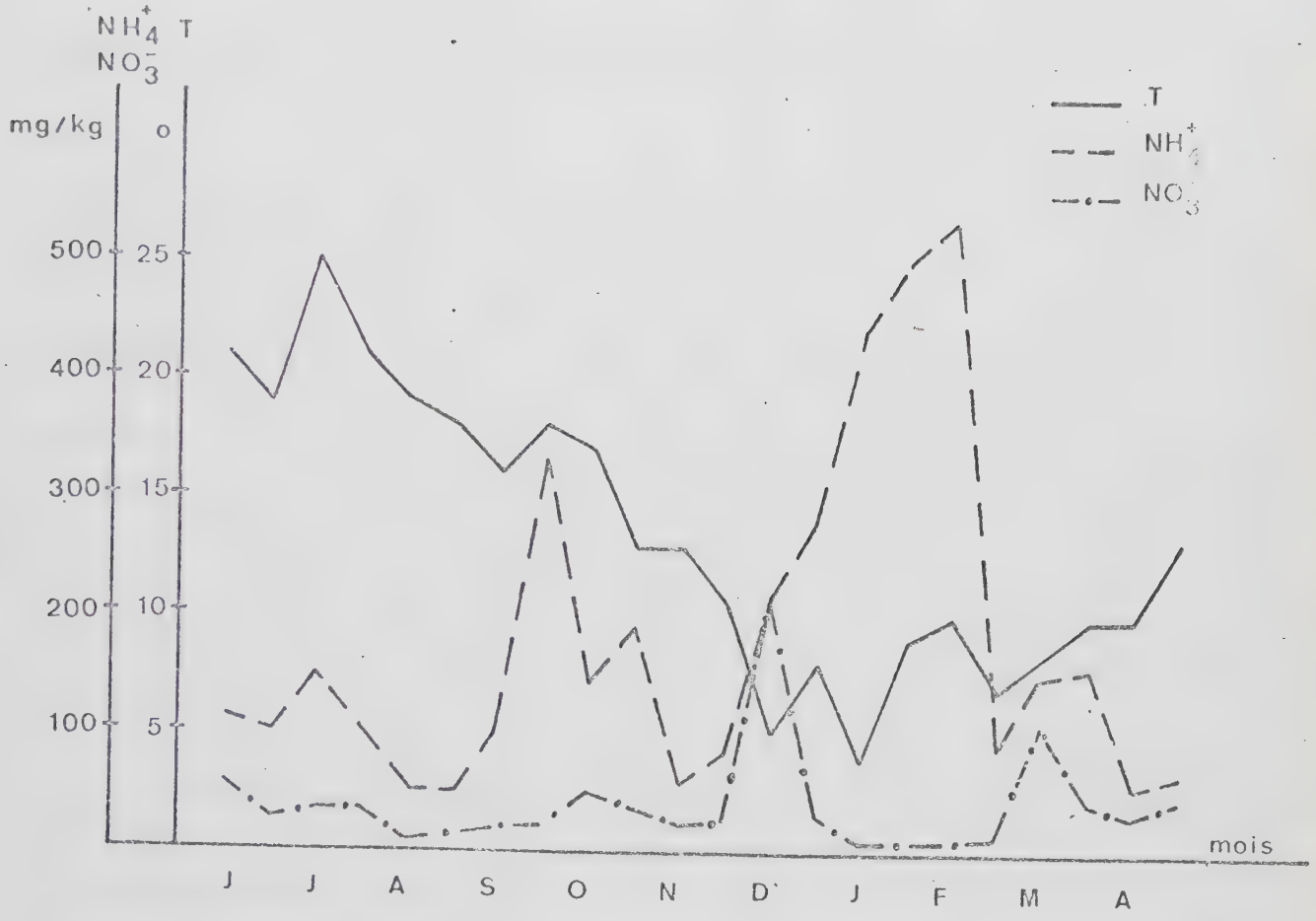


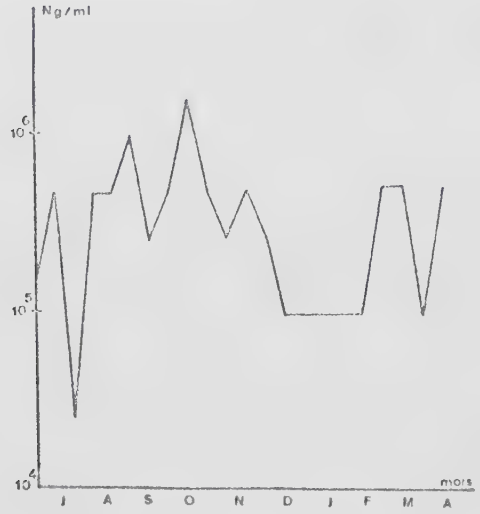
Fig. 14 - Vase de Soustons : Température, N NH_4^+, N NO_3^- en mg par kg de matière sèche.

DATE DE PRELEVEMENT	24-6 1969	8-7 1969	23-7 1969	5-8 1969	19-8 1969	2-9 1969	17-9 1969	30-9 1969	14-10 1969
Température en degrés C	21	19	25	21	19	18	16	18	17
NH_4^+ en mg d'azote par kg de M.S.	144,3	103,9	126,4	103,7	64,3	50,1	102,7	331,7	145,9
NO_3^- en mg d'azote par kg de M.S.	61,80	36,4	43,6	43,2	11,9	20	33	37,3	52,10
Nombre de germes ammonifiants par g de vase humide $x10^3$	150	450	25	450	450	950	250	450	1.500
Nombre de germes nitrifiants par g de vase humide	0	0	25	25	25	25	25	4	25
Nombre de germes cellulolytiques par g de vase humide	150	45	25	95	30	250	45	9	75
Nombre de germes minéralisateurs du soufre.		4.500	45.000	30.000	15.000	45.000	45.000	15.000	6.500

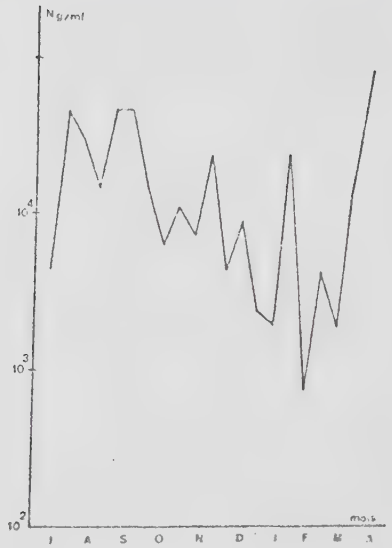
Tableau VIII - Vase de l'étang de Soustons - Données physico-chimiques et microbiologiques.

-10 969	10-11 1969	25-11 1969	9-12 1969	23-12 1969	6-1 1970	20-1 1970	3-2 1970	17-2 1970	3-3 1970	17-3 1970	31-3 1970	14-4 1970
3	13	9,5	5	8	4	9	10	7		10	10	13
93	60,1	86,3	209,3	288,8	446,1	503,5	534,9	90,7	152,8	157,9	59,2	64,8
42,4	15	27,6	25,40	42,70	9,20	13,60	8,50	19,40	116,34	50,54	39,40	48,60
50	250	450	250	95	95	95	95	95	450	450	95	450
25	25		25	9	7	20	20	4	75	11	150	7
50	95	150	25	25	20	4	30	9	95	25	7	150
500	7.500	25.000	4.500	9.500	2.500	2.000	2.500	750	4.500	2.000	45.000	95.000

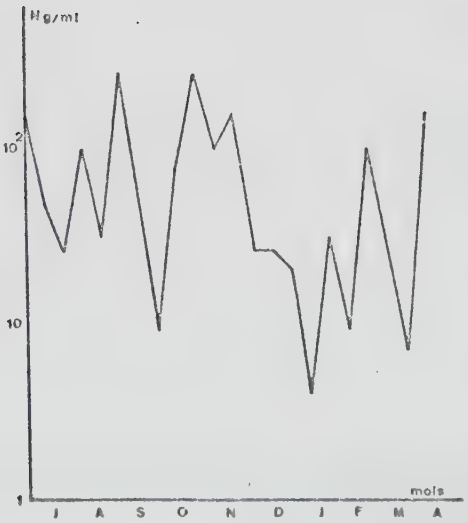
Tableau VIII (suite) - Vase de l'étang de Soustons - Données physico-chimiques et microbiologiques.



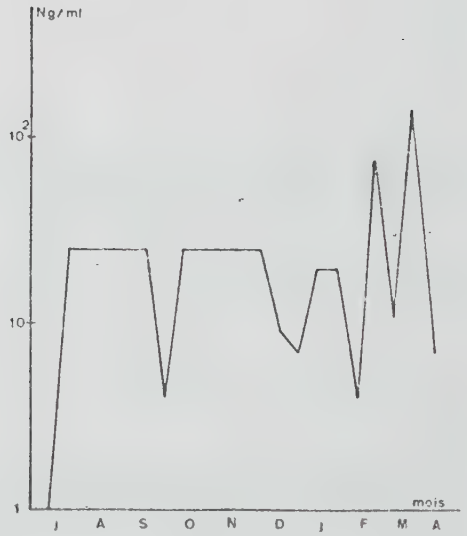
Ammonification



Organo-réduction



Cellulolyse



Nitrification

Fig. 15 - Vase de Soustons : Groupes physiologiques - en ordonnée les logarithmes des nombres de germes par g de vase - en abscisses, les mois de l'année.

Le taux des nitrates reste très faible en été et arrive à un taux appréciable en hiver. Ce phénomène n'est pas aussi net dans la vase de Soustons, ni à la Rouillie, dans l'eau comme dans la vase. On peut attribuer cette faiblesse du taux de nitrate en été, comme celle du taux d'azote ammoniacal que nous retrouvons ici,à la réorganisation effectuée par les algues et les bactéries.

La figure 17 montre les variations du nombre des germes de quatre groupes physiologiques étudiés. Les variations de l'organo-réduction recouvrent en gros celles de l'ammonification en relation avec la température

La nitrification et la cellulolyse ont des variations de même allure et sembleraient être en relation avec le caractère plus ou moins aérobie de l'eau, mais, les faibles nombres trouvés empêchent de tirer plus de conclusions.

Nous avons présenté ici la méthode classique d'étude de l'évolution de biotopes naturels qui consiste à effectuer un certain nombre de mesures physico-chimiques et biologiques et à comparer les résultats après avoir représenté graphiquement leurs variations en fonction du temps. Nous avons pu tirer un certain nombre de conclusions, mais l'interprétation est incomplète car les variables sont, d'une part, soumises à des aléas, et, d'autre part, sont analysées indépendamment.

Aussi certaines méthodes multivariates (analyses factorielles) nous ont paru bien adaptées à l'étude de ces problèmes car le modèle factoriel suppose l'existence de facteurs explicatifs qui déterminent les variables mesurées. Ces méthodes ont été utilisées en hydrobiologie par SAVOURE (1970).

B - ANALYSE MATHEMATIQUE DE CES DONNEES

L'analyse présentée a pour but de mettre en évidence les corrélations entre les variables, au cours d'un cycle annuel, et à rechercher des facteurs ou composantes qui déterminent les variations de tel ou tel groupe de variables. Certains de ces facteurs peuvent présenter une signi-

DATE DE PRELEVEMENT	10-6 1969	24-6 1969	23-7 1969	5-8 1969	19-8 1969	2-9 1969	17-9 1969	30-9 1969	14-10 1969
Température en degrès C	22	21	25	21	19	18	16	18	17
O_2 en % de saturation	105	125	87	103	100	98	85	76	33
NH_4^+ en mg d'azote par litre d'eau	0,50	0,47	0,80	0,55	0,52	0,43	0,60	0,79	2,25
NO_2^- en mg d'azote par litre d'eau	0,006	0,010	0,023	0,005	0,008	0,007	0,18	0,006	0,012
NO_3^- en mg d'azote par litre d'eau	0,064	0,020	0,012	0,000	0,012	0,018	0,062	0,199	0,088
Nombre de germes ammoniafiants par ml d'eau x 10^3	25	7,5	0,450	15	25	250	2,5	9,5	9,5
Nombre de germes nitrifiants par ml d'eau	0	0	0	0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Nombre de germes organoréducteurs par ml d'eau	0,9	0	0	0,9	0,7	2,5	0,4	0	0
Nombre de germes cellulolytiques par ml d'eau	750	750	95	950	750	15	20	9,5	95

Tableau IX - Eau de l'étang de Soustons - Données physico-chimiques et microbiologiques.

3-10 969	10-11 1969	25-11 1969	9-12 1969	23-12 1969	20-1 1970	3-2 1970	17-2 1970	17-3 1970	31-3 1970	14-4 1970	28-4 1970	12-5 1970
13	13	9,5	5	8	9	10	7	10	10	13	11	17
68	68	64	73	52	89	83	94	92	73	88	75	86
0,44	0,48	1,55	1	0,48	0,52	1	1,10	1,14	0,78	0,60	0,70	0,75
),006	0,013	0,019	0,018	0,016	0,016	0,030	0,040	0,010	0,012	0,014	0,013	0,009
),096	0,377	0,431	0,705	0,559	0,414	0,520	0,740	0,490	0,408	0,636	0,387	0,471
,5	0,095	9,5	4,5	0,95	0,025	0,95	2,5	0,045	0,45	0,095	4,5	2,5
2,5	2,5	0	0	0,4	4,5	0,9	0,9	0	0,7	1,5	0	2
0	0	0	4	1,1	2,5	20	200	45	4,5	4	25	15
30	4,5	30	0,9	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0

Tableau IX (suite) - Eau de l'étang de Soustons - Données physico-chimiques et microbiologiques.

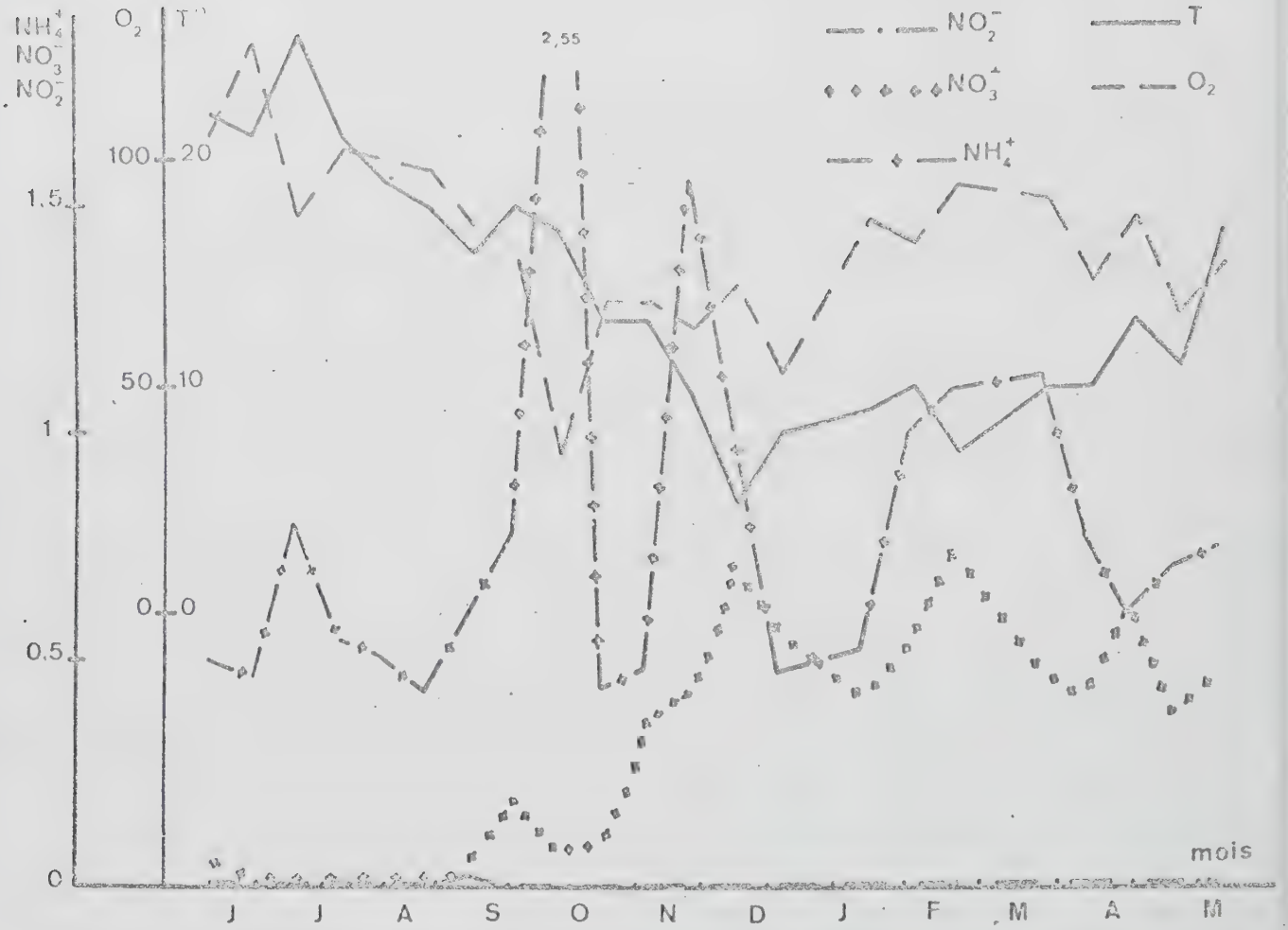
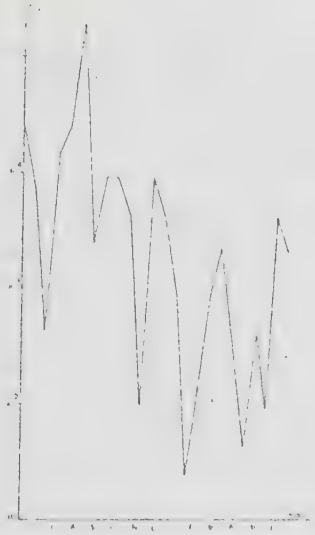
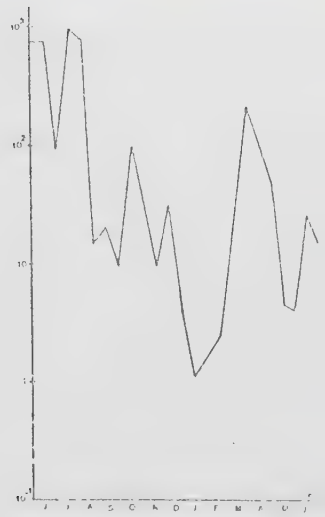


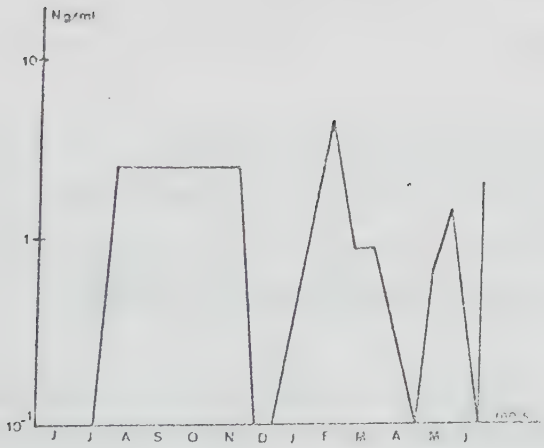
Fig. 16 - Eau de Soustons : Température, Oxygène en pourcentage de saturation, N NH_4^+, N NO_2^-, N NO_3^- en mg par 1 d'eau.



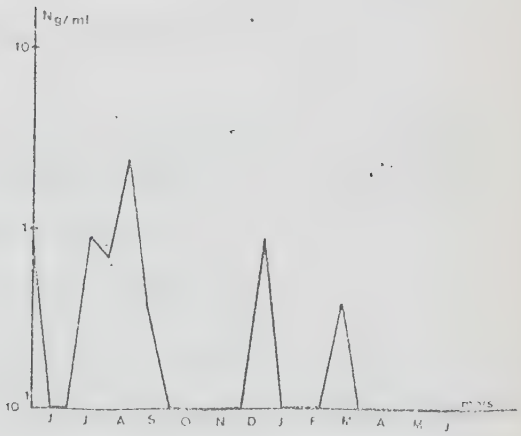
Ammonification



Organo-réduction



Nitrification



Cellulolyse

Fig. 17 - Eau de Soustons : Groupes physiologiques - en ordonnée, le logarithme du nombre de germes par ml d'eau - en abscisse, les mois de l'année.

fication biologique intéressante qui n'apparaît pas clairement par la méthode classique d'analyse des données.

1) Principe des méthodes utilisées

Les deux méthodes utilisées ici ont des caractéristiques communes

- chaque variable peut être considérée comme un vecteur dans l'espace des dates de prélèvement, les coordonnées de ce vecteur sur les axes qui sont les dates de prélèvement sont les valeurs prises par cette variable aux différentes dates ;

- de même chaque date de prélèvement peut être considérée comme un vecteur dans l'espace des variables ; ses coordonnées sont représentées par les valeurs prises par chacune des variables à la date considérée. Les différents facteurs ou composantes sont indépendants entre eux et permettent de se rendre compte des proximités, c'est-à-dire, les liaisons entre variables et de confronter l'ordre des variables sur chacun des facteurs mis en évidence par l'analyse.

Nous avons utilisé deux types d'analyses factorielles définies par LEBART et FENELON (1971) :

a) l'analyse factorielle en composantes principales qui permet de mettre en évidence au mieux les relations de proximité entre individus (ici dates des prélèvements) dans l'espace des variables (ici les différents facteurs physico-chimiques et biologiques mesurés) ;

Dans ce cas, la "variable d'étude" est la matrice des corrélations il s'agit d'un tableau qui exprime par des chiffres allant de -1 à 1 le degré de liaison linéaire entre les différentes variables. Les chiffres ne s'interprètent facilement qu'en supposant que chacune des variables a une distribution normale, c'est-à-dire que ses valeurs en fonction du temps constituent une courbe de GAUSS.

b) l'analyse factorielle des correspondances qui utilise les relations existant entre couples d'éléments de l'ensemble des individus et des variables (correspondance binaire) pour définir la proximité entre éléments d'un même ensemble (deux éléments d'un même ensemble sont proches s'ils s'associent de la même façon aux éléments de l'autre ensemble) ou d'ensembles différents (par exemple ici proximité entre certaines dates de prélèvements et certaines variables) ; les éléments d'un ensemble sont proches d'un élément de l'autre ensemble s'ils s'associent souvent avec lui.

On montre par une démonstration mathématique complexe qu'on peut représenter sur une même graphique les individus et les variables ; les distances sont alors conservées et, en d'autres termes, la représentation d'un point (individu ou variable dans l'espace-produit de l'espace des individus et de celui des variables) est la même que dans l'espace d'origine

2) Présentation des résultats

Avant l'analyse, les variables correspondant à des nombres de germes ont subi des transformations logarithmiques ; ceci est tout à fait logique, car la donnée brute mesurée par la méthode des suspensions dilutions est en réalité un logarithme du nombre des germes.

Les résultats sont rassemblés sous forme de tableaux et de figures. Pour chaque eau et chaque vase, on présente deux tableaux et deux graphes :

a) Tableau des corrélations

Il indique les coefficients de corrélations des variables deux à deux. Rappelons que le coefficient de corrélation, variant entre -1 et+1, est une mesure de la liaison négative ou positive entre deux variables.

b) Tableau des saturations et communautés

La saturation est un coefficient de corrélation entre une variable et un facteur, et mesure ainsi l'aptitude qu'a le facteur à expliquer,

c'est-à-dire à rendre compte des variations de la variable considérée. La communauté mesure l'aptitude qu'a l'ensemble des facteurs considérés à expliquer la variable.

Les coefficients de corrélation, de saturation et de communauté varient entre 0 et 1 ; la liaison et l'explication sont d'autant meilleures que les valeurs de coefficient définies ci-dessus sont proches de 1.

c) Graphe de la représentation des dates de prélèvements dans le plan des deux premiers facteurs de l'espace des variables (analyse factorielle et en composantes principales)

d) Graphe de la représentation des dates de prélèvements et des variables dans le plan des deux premiers facteurs de l'espace produit, de l'espace des variables et de l'espace des dates de prélèvements (analyse des correspondances).

Dans la présentation des résultats, il ne nous a pas semblé logique de séparer l'analyse factorielle des correspondances de l'analyse factorielle et en composantes principales car elles sont complémentaires et peuvent fournir des visions plus ou moins déformées ou plus ou moins agrandies d'un même phènomène. Aussi, en cas d'ambiguité, nous préciserons le type d'analyse en utilisant le symbolisme (CP) pour analyse en composantes principales et (FC) pour factorielle des correspondances.

Sur les divers tableaux, les variables non transformées sont données avec les mêmes unités que dans les tableaux de données. Pour faciliter la lecture, la deuxième colonne des tableaux comporte le nom de la variable et le symbole qui lui est attribué.

Les termes tels que "ammonification", "organoréduction" etc... sont des formes abrégées de "nombre de germes ammonifiants", "nombre de germes minéralisant le soufre organique" etc...

3) Liens entre les facteurs extrinsèques et la biologie du milieu

Nous avons recherché les liaisons et les corrélations entre les variables physiques et chimiques et les caractères microbiologiques, en envisageant pour chaque étang d'abord la vase puis l'eau

a) Vase de l'étang de la Rouillie

L'examen du tableau X permet d'ordonner les corrélations entre les différentes variables. Certaines de ces liaisons étaient prévisibles, par exemple entre la teneur en matière organique et le carbone organique. En effet, dans le cas des humus doux, on peut passer de la teneur en carbone organique à la teneur en matière organique sur simple multiplication par un coefficient constant (DUCHAUFOUR, 1960). Le tableau des saturations et communautés révèle le fait suivant :les variations de 7 des 10 variables étudiées sont produites par deux variables indépendantes (facteurs) ; le plan des deux premiers facteurs (fig. 18) constituera donc une bonne représentation des variations de ces 7 variables, bien qu'il ne représente que 62 % de la variation de l'ensemble des variables. En effet, les variables, températures, teneur en azote ammoniacal, en azote nitrique, en azote total, sont assez bien expliquées par le modèle (communautés respectives de : 0,938, 0,968, 0,926 et 0,867) et sont bien représentées dans le premier facteur (variable indépendante)avec des saturations de 0,635, 0,887, 0,855 et 0,828). Notons ici l'opposition entre la température et les formes de l'azote en particulier l'azote ammoniacal. Notons également le fait que l'azote ammoniacal et l'azote nitrique sont des variables dépendantes. Le deuxième facteur oppose la matière organique et le carbone (saturation 0,788 et 0,727) au nombre de germes nitrifiants (saturation -0,772). Le troisième facteur ne donne qu'une idée, car les saturations de l'ammonification, dénitrification et fixation anaérobie sont faibles (0,508, 0,546, 0,535) ; cependant ces trois variables semblent avoir des variations concomitantes. Notons la faible explication de l'ammonification (communauté 0,588)

L'examen de la figure 18 (graphe CP) montre la séparation de l'année en deux périodes (vis-à-vis des variables étudiées) : une période froide (Novembre, Décembre, Janvier) et une période rassemblant les autres mois de l'année.

VARIABLES		X 1	X 2	X 3	X 4	X 5	X 6	X 7	X 8	X 9	X 1
Température	X 1	1									
$N_{NH_4}^+$	X 2	-0,480	1								
$N_{NO_3}^-$	X 3	-0,392	0,984	1							
N	X 4	-0,710	0,842	0,746	1						
Matière organique	X 5	-0,109	0,258	0,089	0,032	1					
C	X 6	-0,146	0,234	0,275	0,168	0,900	1				
Log (Ammonification)	X 7	-0,342	-0,274	-0,293	-0,135	0,345	0,216	1			
Log (Nitrification)	X 8	-0,116	0,055	-0,078	0,020	-0,484	-0,542	-0,170	1		
Log (Dénitrification)	X 9	-0,124	-0,350	-0,334	-0,194	-0,103	-0,111	0,258	0,283	1	
Log (Fixation anaérobie)	X 10	0,322	-0,170	-0,169	-0,156	-0,217	-0,403	0,042	0,730	0,357	1

TABLEAU DES SATURATIONS ET COMMUNAUTES

	X 1	X 2	X 3	X 4	X 5	X 6	X 7	X 8	X 9	X 10	Part de varia- non cumulée	Part de varia- cumul
1er facteur, Xi)	-0,635	0,887	0,855	0,828	0,295	0,509	-0,268	-0,313	-0,430	-0,504	36 %	36 %
2e facteur, Xi)	0,265	-0,335	-0,305	-0,328	0,788	0,727	0,507	-0,772	-0,105	-0,487	26 %	62 %
3e facteur, Xi)	0,008	0,167	0,176	0,232	0,391	0,311	0,508	0,372	0,546	0,535	13 %	75 %
4e facteur, Xi)	-0,680	-0,199	-0,265	0,136	-0,178	-0,022	0,018	-0,208	0,631	-0,269	12 %	87 %
COMMUNAUTE	0,938	0,968	0,926	0,867	0,894	0,884	0,588	0,879	0,894	0,853		

Tableau X - Tableau des corrélations et tableau des saturations et communautés des variables étudiées dans la vase de la Rouillie (les symboles des variables sont précisés à coté de celles-ci dans la première colonne du premier tableau).

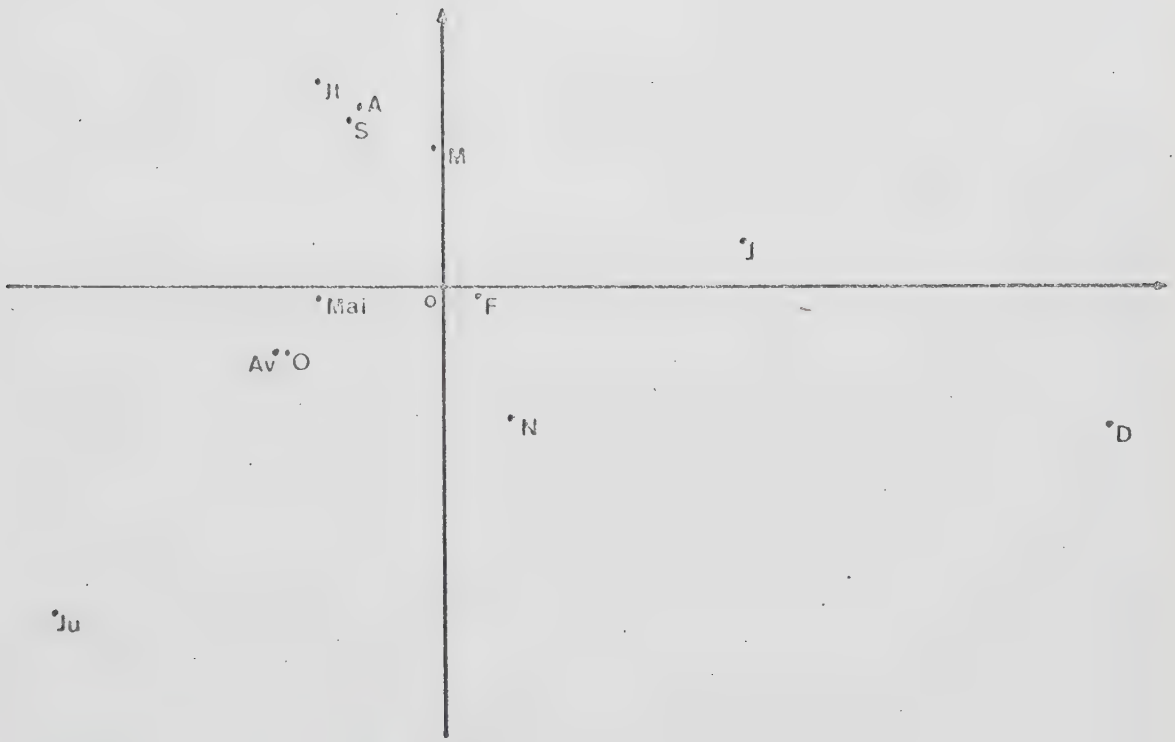


Fig. 18 - Vase de la Rouillie : Analyse en composantes principales (CP). Dates de prélèvements dans l'espace des variables (J = Janvier ; F = Février ; M = Mars ; Av= Avril;Mai = Mai Ju= Juin, Jt = Juillet ; A = Août ; S = Septembre ; O = Octobre N = Novembre ; D = Décembre.).

La figure 19 (graphe FC) nous montre le comportement de l'azote nitrique vis-à-vis de l'azote ammoniacal : les deux variables sont proches l'une de l'autre par rapport aux autres, donc sont liées.

On observe également la proximité relative de la température et du nombre de germes ammonifiants : la liaison n'est pas très nette mais existe.

Nous relevons donc ici à la fois une opposition entre température et germes ammonifiants vis-à-vis des formes de l'azote, en particulier de l'azote ammoniacal.

L'opposition entre matière organique et nombre de germes nitrifiants autotrophes pourrait indiquer l'existence d'une nitrification hétérotrophe d'autant plus que la liaison entre NH_4^+ et NO_3^- montre que la nitrification ne se fait que faiblement aux dépens de l'azote ammoniacal.

b) Eau de l'étang de La Rouillie

L'examen du tableau XI des facteurs des saturations et des communautés révèlent le fait suivant: les variations des cinq variables étudiées sont produites par deux variables indépendantes, on peut donc représenter la configuration vectorielle dans un espace à deux dimensions ; en effet, les variables, températures, teneur en azote ammoniacal, nombre de germes ammonifiants sont bien expliqués par le modèle (communautés respectivement de 0,937, 0,957, 0,813) et ces trois variables sont fortement représentées dans le premier facteur (1ére variable indépendante) avec des saturations respectivement égales à -0,929, 0,799 et -0,900. Notons ici que le phénomène est beaucoup plus accentué que dans le cas de la vase, surtout en ce qui concerne le nombre de germes ammonifiants beaucoup mieux expliqué ici (0,813 au lieu de 0,588). La teneur en azote ammoniacal a un signe opposé à la fois à la température et au nombre de germes ammonifiants : le tableau des corrélations nous montre bien une forte corrélation négative entre température et azote ammoniacal (-0,919) et une corrélation positive (0,736) entre température et nombre de germes ammonifiants. La teneur en oxygène varie dans le même sens que l'azote ammoniacal.

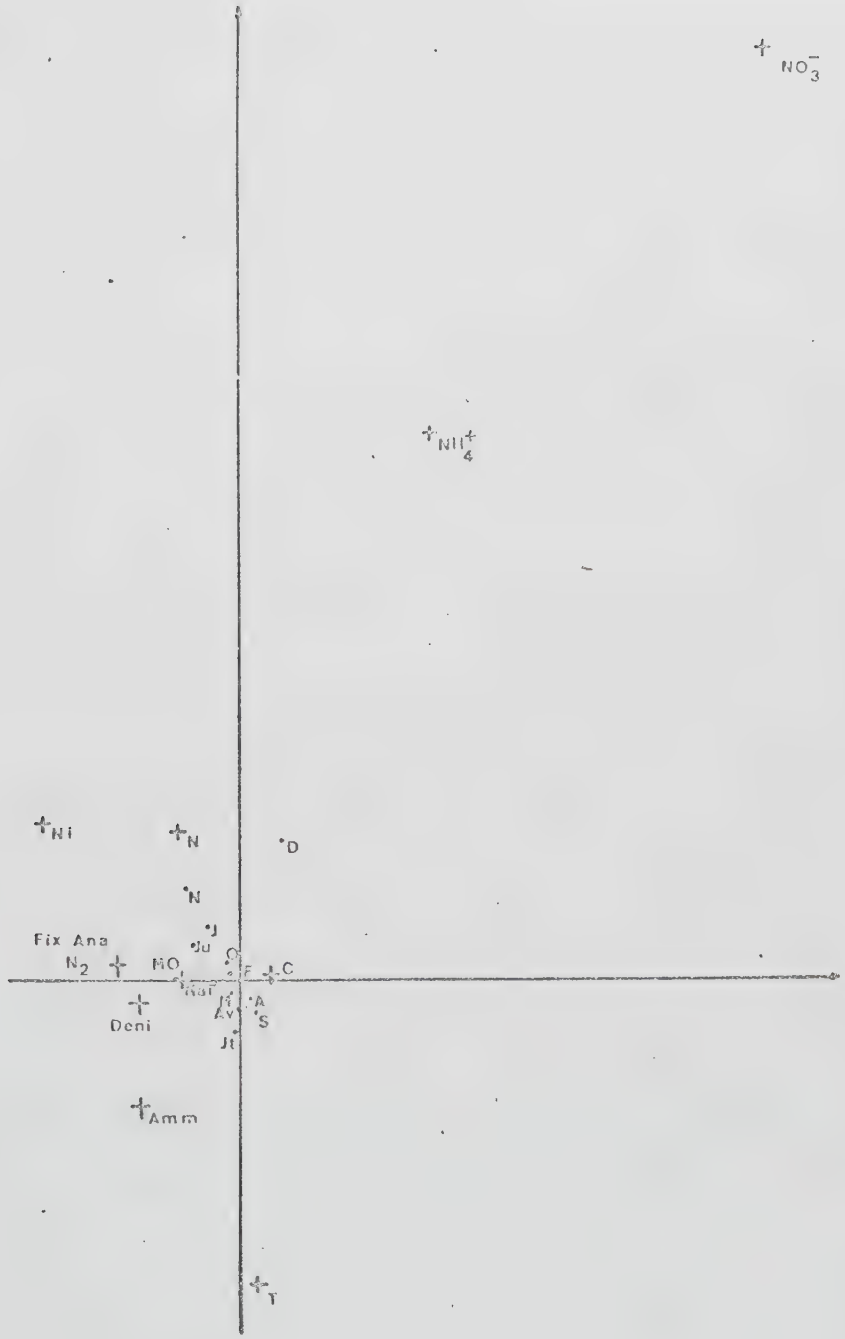


Fig. 19 - Vase de la Rouillie - Analyse factorielle des correspondances(F.C
Déni : Nombre de germes dénitrifiants
Am : Nombre de germes ammonifiants
Ni : Nombre de germes nitrifiants
T : Température
Fix Ana N_2 : Nombre de fixateurs anaérobies de l'azote
NH_4^+ NO_3^- : Formes de l'azote.

COEFFICIENTS DE CORRELATION

VARIABLES		X 1	X 2	X 3	X 4	X 5
Température	X 1	1				
$N_{NH_4}^+$	X 2	- 0,919	1			
$N_{NO_3}^-$	X 3	- 0,255	0	1		
O_2	X 4	- 0,496	0,217	0,464	1	
Log(Ammonification)	X 5	0,736	- 0,655	- 0,332	- 0,638	1

TABLEAU DES SATURATIONS ET DES COMMUNAUTES

	X 1	X 2	X 3	X 4	X 5	Part de variation	
						non cumulée	cumulée
1er facteur , Xi)	- 0,929	0,799	0,433	0,706	- 0,900	60 %	60 %
2e facteur , Xi)	0,270	- 0,563	0,763	0,499	- 0,020	24 %	84 %
COMMUNAUTE	0,937	0,957	0,769	0,747	0,813		

Tableau XI - Tableau des corrélations et tableau des saturations et communautés des variables étudiées dans l'eau de la Rouillie (les symboles des variables sont précisés dans la première colonne du premier tableau).

Le second facteur (deuxième variable indépendante) met en évidence l'azote nitrique avec une saturation de 0,763 ; cette variable est relativement expliquée par l'ensemble de deux facteurs (communauté de 0,769).

Le plan des deux facteurs permet donc de concevoir deux mécanismes indépendants : la teneur en azote ammoniacal en opposition avec la température et le nombre de germes ammonifiants d'une part, et la teneur en azote nitrique d'autre part.

Cette opposition entre température et teneur en azote ammoniacal, déjà observée par BRAUNE et UHLEMANN (1968) peut sembler paradoxale au premier abord du fait de l'action positive de la température sur le nombre de germes ammonifiants, c'est-à-dire producteurs d'azote ammoniacal ; on peut expliquer ce phénomène en tenant compte de la flore algale, planctonique ou benthique et de la flore phanérogamique. En effet, ces divers types de flore ont une activité métabolique très importante en été, et très réduite en hiver et on peut admettre qu'en fait, une grande partie de l'azote ammoniacal produit par minéralisation pendant les mois chauds est très rapidement réorganisée alors que, pendant les mois froids, il s'accumule dans l'eau même si la quantité produite par unité de temps est plus faible qu'en été. Cette hypothèse ne peut être vérifiée ici car l'analyse à un instant donné ne porte que sur le bilan global de l'azote ammoniacal présent. Cette influence de la microflore algale a été précisée par VAN MEEL (1971) qui a observé dans un canal à courant lent un maximum hivernal de NO_3^- et NH_4^+ accompagnée d'un minimum du phytoplancton et un minimum estival de NO_3^- et NH_4^+ avec un maximum de phytoplancton. OVERBECK (1965) a observé, d'autre part, une certaine concomitance entre les développements des algues et des bactéries dans le grand lac de PLÖN.

L'examen de la figure 20 (graphe de l'analyse CP) montrant les mois de prélèvements dans le deuxième factoriel de l'espace des cinq variables, montre une séparation nette entre les mois froids et chauds.

Les mois d'Octobre à Avril sont situés dans la partie droite du graphe et les mois de Mai à Septembre dans la partie gauche.

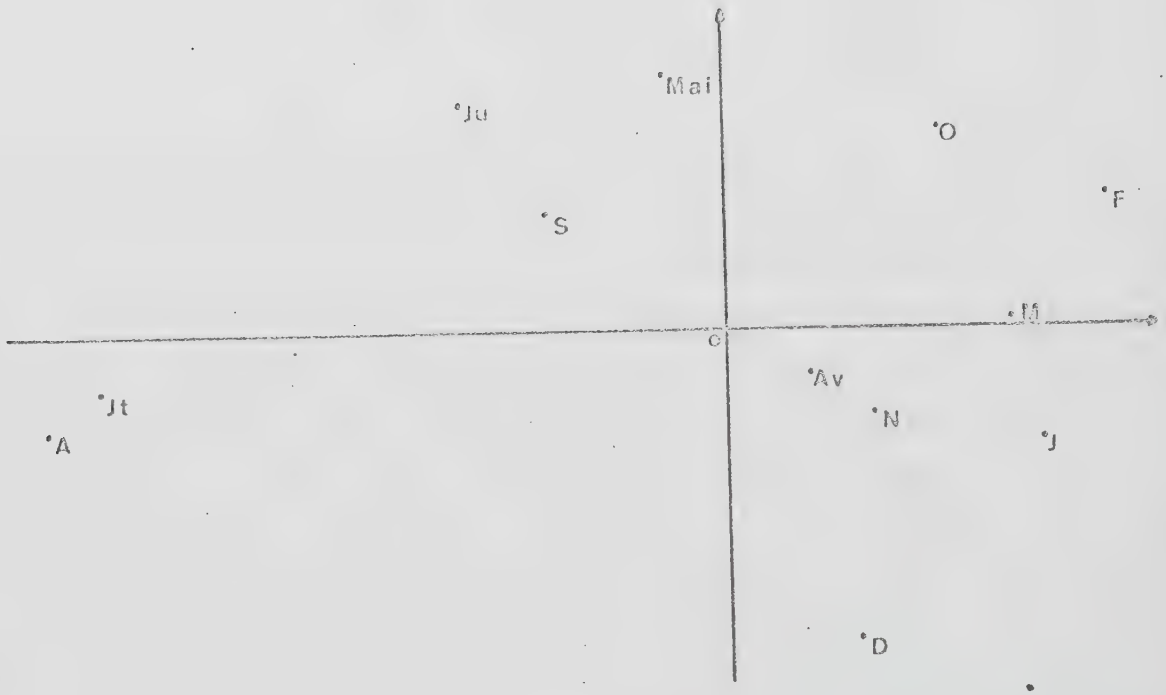


Fig. 20 - Eau de la Rouillie : analyse factorielle (C.P.) et en composantes principales.

Les mois situés dans la partie gauche du graphe correspondent aux valeurs négatives élevées des saturations sur le premier facteur (température -0,929, nombre de germes ammonifiants -0,900) et dans la partie droite aux valeurs positives élevées sur le premier facteur (NH_4^+ = 0,799). Ceux situés dans la partie supérieure correspondent aux saturations positives élevées sur le deuxième facteur (NO_3^- 0,763).

La figure 21, graphe de l'analyse FC grossit encore le phénomène et accroît l'importance du premier facteur qui souligne également une très nette différence entre les mois froids et les mois chauds et met en évidence l'opposition entre température et nombre de germes ammonifiants d'une part, et teneur en azote ammoniacal d'autre part.

La présence de l'oxygène près du zéro montre que cette variable ne représente qu'une faible source de variation.

A la différence de la vase, on observe ici l'indépendance des deux variables NH_4^+ et NO_3^- ; ceci pourrait provenir des nombreuses causes de disparition des nitrates dans l'eau.

En conclusion, on relève dans la vase comme dans l'eau le rôle très important de la température avec une atténuation des phénomènes dans la vase ; on peut admettre ici que même si les variations de température dans la vase sont du même ordre que dans l'eau, elles retentissent moins sur les autres variables, la vase étant un milieu moins sensible aux variations que l'eau qui forme elle-même un écran entre la vase et l'atmosphère. L'opposition entre la température et le nombre de germes ammonifiants vis-à-vis de la teneur en azote ammoniacal est bien marquée. Par contre, l'azote nitrique a un comportement différent dans les deux milieux ; ceci pourrait provenir, comme nous l'avons vu, de la prédominance de la nitrification hétérotrophe dans la vase.

c) Vase de l'étang de Soustons

Les liaisons entre variables n'apparaissent pas au niveau du tableau des corrélations (tableau XII). Le tableau des saturations et communautés met en évidence sur le premier facteur l'opposition trouvée

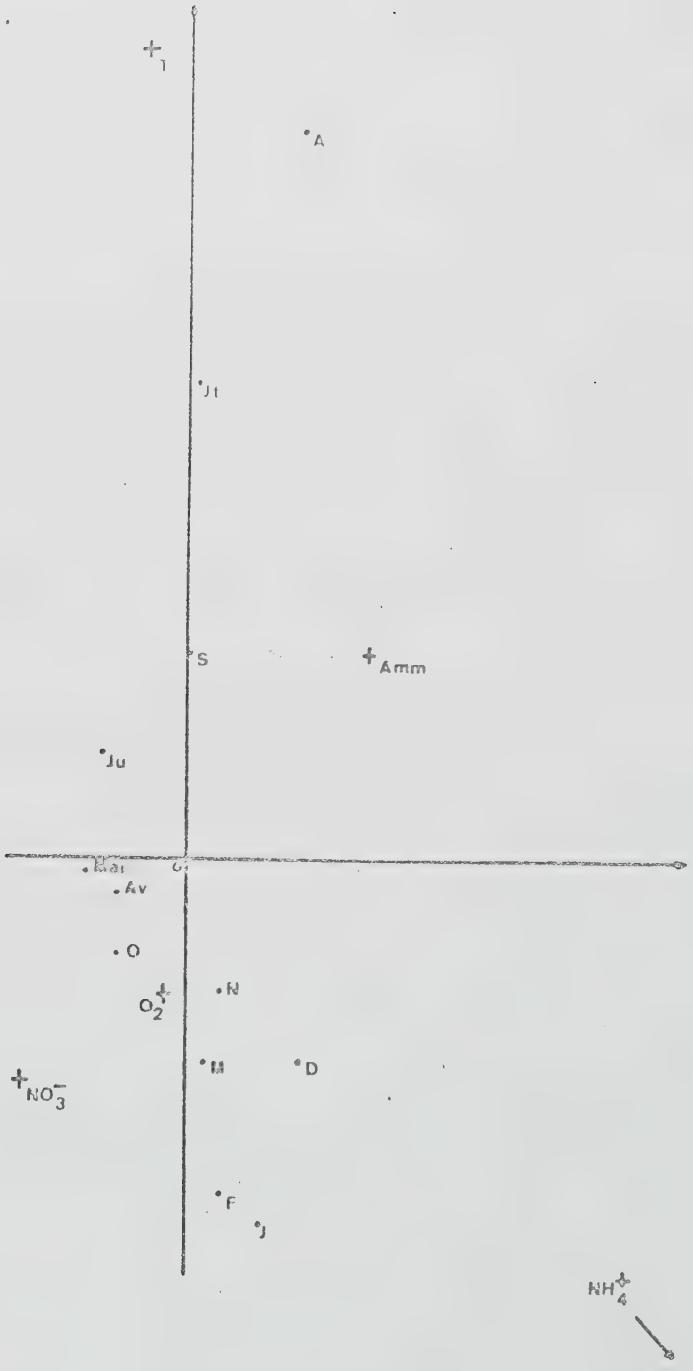


Fig. 21 - Eau de la Rouillie : Analyse factorielle des correspondances (F.C.)

COEFFICIENTS DE CORRELATION

VARIABLES		X 1	X 2	X 3	X 4	X 5	X 6	X 7
Température	X 1	1						
NH_4^+	X 2	- 0,451	1					
NO_3^-	X 3	0,345	- 0,403	1				
Log (Ammonification)	X 4	0,272	- 0,373	0,283	1			
Log (Nitrification)	X 5	0,362	- 0,442	0,245	0,591	1		
Log (Cellulolyse)	X 6	0	- 0,128	-0,018	- 0,111	0,044	1	
Log (Organo-réduction)	X 7	0,542	- 0,304	0,275	0,086	0,436	0,411	1

FACTEURS - TABLEAU DES SATURATIONS ET COMMUNAUTES

	X 1	X 2	X 3	X 4	X 5	X 6	X 7	Part de variatio	
								n. cumulée	cumul
(1er facteur, Xi)	0,727	-0,736	0,590	0,611	0,757	0,176	0,670	41 %	41 %
(2e facteur, Xi)	0,078	0,057	-0,139	-0,535	- 0,176	0,818	0,575	19 %	60 %
(3e facteur, Xi)	0,351	-0,072	0,537	-0,402	- 0,451	-0,318	0,029	13 %	73 %
COMMUNAUTE	0,657	0,551	0,656	0,823	0,808	0,802	0,780		

Tableau XII - Tableau des corrélations et tableau des saturations et communautés des variables étudiées dans la vase de Soustons (les symboles des variables sont précisés dans la première colonne du 1er tableau).

à la Rouillie entre température et teneur en azote ammoniacal. La figure 22 montre une opposition nette entre les mois chauds et froids pour l'ensemble des variables étudiées ; la position du mois d'Avril est difficilement interprétable. Ceci montre que la vase est sensible principalement aux écarts très importants de température, ce qui confirme ce qui avait été noté dans l'étang de la Rouillie. La figure 23, graphe de l'analyse FC, met également en évidence la séparation des deux périodes de l'année et met en opposition l'ensemble des variables représentant les groupes physiologiques et la température avec la teneur en azote ammoniacal. La positi de l'azote nitrique plus proche des mois chauds pourrait indiquer une différence sélective d'assimilation par la flore entre l'azote nitrique et l'azote ammoniacal.

d) Eau de l'étang de Soustons

L'examen du tableau XIII montre que le tableau des corrélations est beaucoup plus éclaté que dans le cas de l'eau de la Rouillie, c'est-à-dire que les liaisons entre variables sont beaucoup moins fortes en général On voit cependant apparaître une corrélation négative entre température et azote nitrique. Le tableau des facteurs, saturations et communautés montre dans le premier facteur (45 % de la variation totale) une opposition entre température et nombre de germes ammonifiants d'une part, et azote nitrique d'autre part, avec respectivement des saturations de 0,863, 0,755 et -0,899 Ces trois variables sont bien expliquées par le modèle.

Le deuxième facteur (18 % de la variabilité totale) oppose le nombre de germes nitrifiants à l'azote ammoniacal (saturations : 0,752 et -0,661). Notons que la variable azote ammoniacal est la moins bien expliqué par le modèle. Ceci est une présomption du rôle important de la nitrificati autotrophe dans l'eau.

Les figures 24 et 25, graphe dans le premier plan factoriel des deux analyses CP et FC permet de distinguer nettement la séparation faite entre les trois périodes de l'année : froide, moyenne, chaude. Les mois chauds sont caractérisés par des teneurs faibles en composés azotés et des nombres de germes élevés.

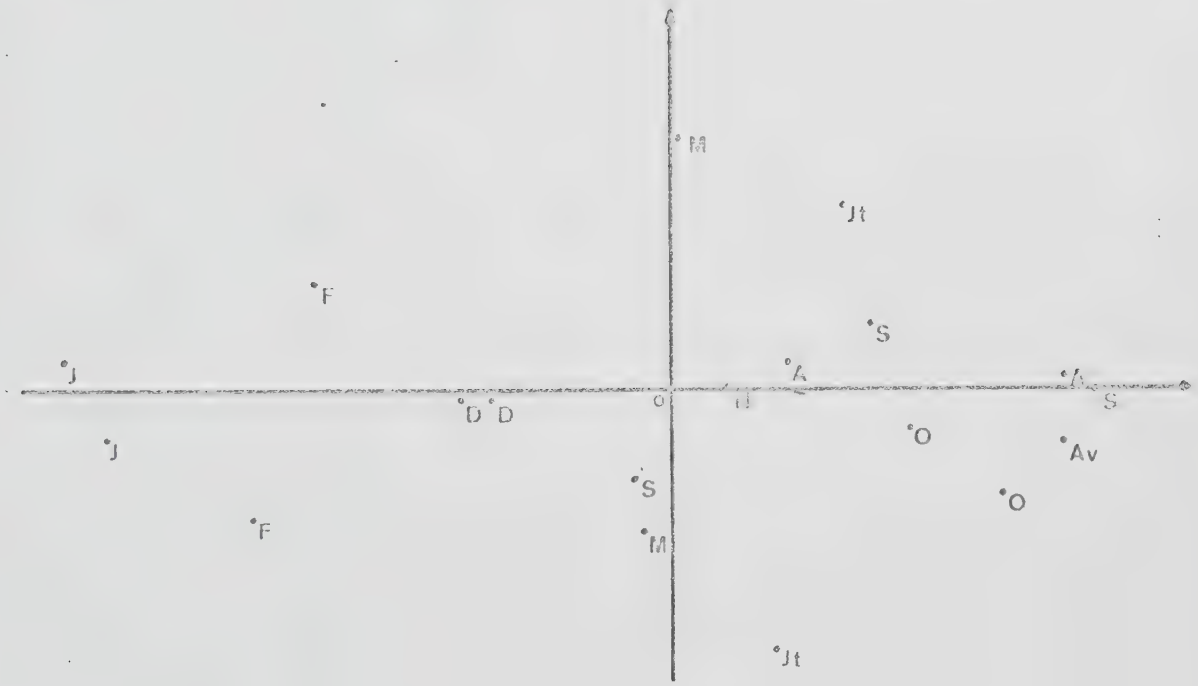


Fig. 22 - Vase de Soustons : Analyse en composantes principales (C.P)

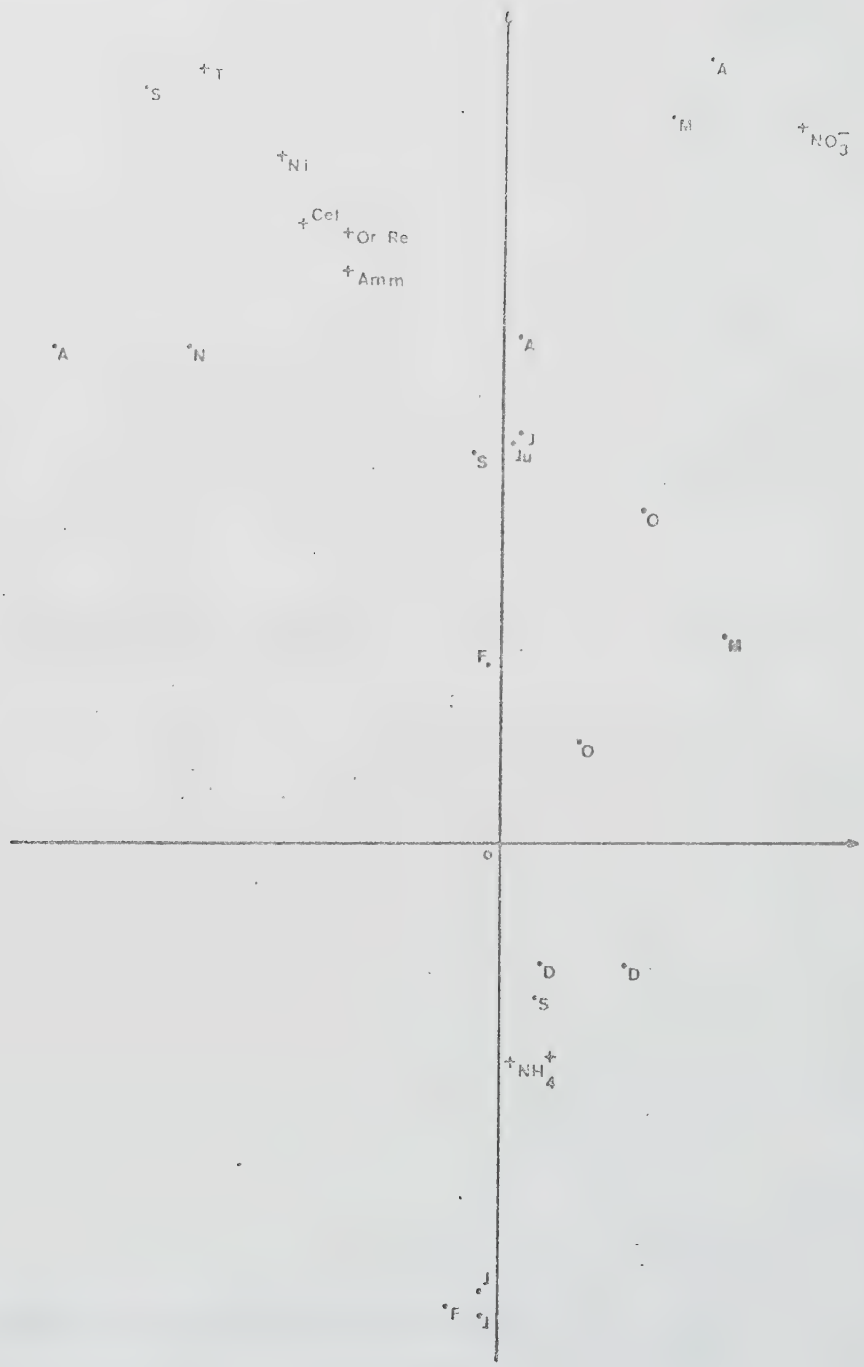


Fig. 23 - Vase de Soustons : Analyse factorielle des correspondances (F.C
Cell = Nombre de germes cellulolytiques
OrRe = Nombre de germes minéralisant le soufre organique.

COEFFICIENTS DE CORRELATION

VARIABLES		X 1	X 2	X 3	X 4	X 5	X 6	X 7	X 8	X 9
empérature	X 1	1								
H_4^+	X 2	-0,452	1							
O_3^-	X 3	-0,636	0,527	1						
O_2	X 4	-0,458	0,525	0,585	1					
2	X 5	0,590	-0,252	-0,473	-0,149	1				
pg (Ammonification)	X 6	0,403	-0,128	-0,512	-0,275	0,267	1			
pg (Nitrification)	X 7	-0,290	-0,405	-0,040	-0,103	-0,103	0,115	1		
pg (Cellulolyse)	X 8	0,272	-0,254	-0,372	-0,243	0,354	0,657	0,0190	1	
pg (Organo-réduction)	X 9	0,646	-0,158	-0,615	-0,570	0,684	0,595	-0,264	0,291	1

TABLEAU DES SATURATIONS ET COMMUNAUTES

	X 1	X 2	X 3	X 4	X 5	X 6	X 7	X 8	X 9	Part de variatio	
										n.cumulée	cumulé
r facteur,Xi)	0,863	-0,557	-0,899	-0,559	0,684	0,680	-0,012	0,582	0,755	45 %	45 %
facteur,Xi)	0,028	-0,661	-0,140	-0,515	-0,274	-0,282	0,752	-0,081	-0,489	18 %	63 %
facteur,Xi)	-0,331	0,080	0,138	-0,052	-0,305	0,559	0,119	0,695	-0,194	12 %	75 %
facteur,Xi)	-0,076	-0,121	0,157	0,539	0,382	-0,067	0,540	0,170	0,173	10 %	85 %
mmunauté	0,862	0,770	0,874	0,873	0,783	0,859	0,871	0,857	0,878		

Tableau XIII - Tableau des corrélations - Tableau des saturations et communautés des variables étudiées dans l'eau de Soustons (les symboles des variables sont précisés dans la première ligne du 1er tableau).

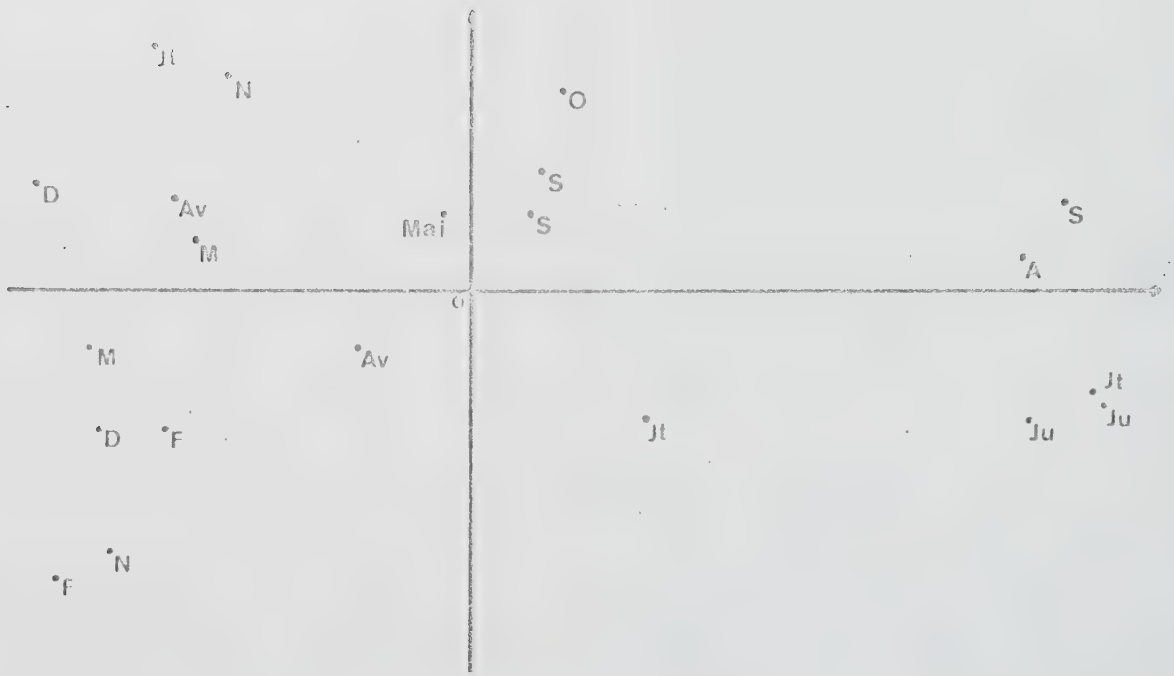


Fig. 24 - Eau de Soustons : Analyse en composantes principales (C.P)

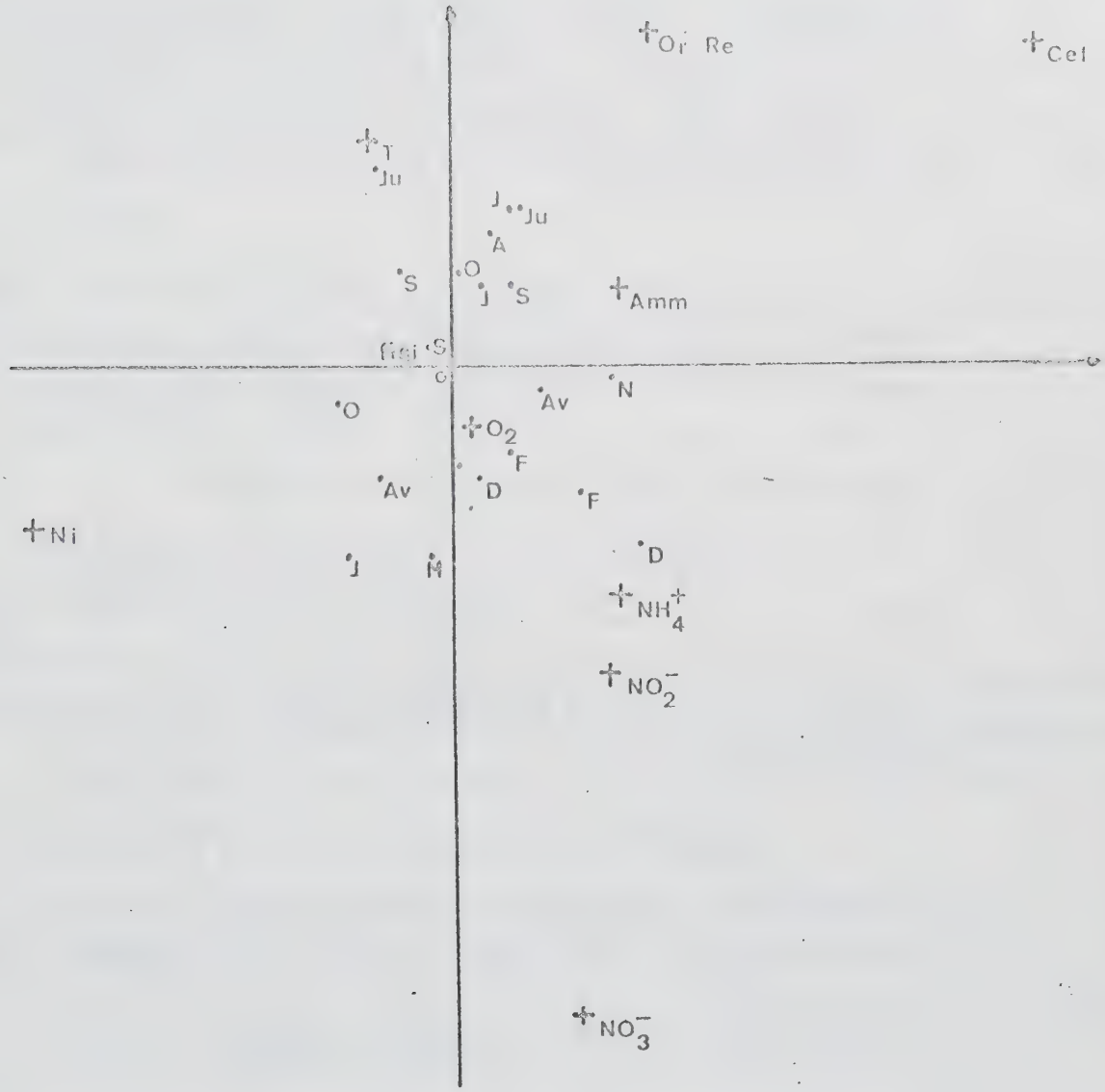


Fig. 25 - Eau de Soustons : Analyse factorielle des correspondances (F.C)

La figure 25, graphe de l'analyse des correspondances met en évidence quatre groupes de variables opposés deux à deux :

1 - température, nombre de germes ammonifiants opposés aux composés azotés
2 - nombre de germes nitrifiants opposés à minéralisateurs du soufre organique ; la position des germes cellulolytiques est difficilement interprétable ici ; de toutes façons les nombres de germes trouvés étaient souvent très faibles.

On retrouve comme dans l'étang de la Rouillie l'opposition température et le nombre de germes ammonifiants vis-à-vis de l'azote ammoniacal. Notons cependant que la variable nombre de germes ammonifiants est proche de zéro, ce qui implique que ses variations sont faibles, c'est-à-dire qu'elle s'écarte peu de sa variation moyenne.

L'opposition entre nombre de germes nitrifiants et nombre de germes minéralisateurs du soufre organique peut être considérée comme la représentation d'un axe aérobiose anaérobiose. Le milieu aquatique évoluant de la gauche vers la droite du graphique d'une bonne aération vers des conditions plus réductrices.

Notons ici que l'information (nombre de variables et rythme des prélèvements) est beaucoup plus riche que dans l'étang de la Rouillie ; les indications que l'on peut tirer sont donc évidemment plus nombreuses.

C - CONCLUSION : Problèmes posés par l'azote.

Ce travail permet, d'une part, de tirer des renseignements d'ordre écologique et d'autre part, de mettre en évidence les problèmes posés par le cycle de l'azote dans les eaux.

Au point de vue écologique, la séparation de l'année en mois chauds et froids avec une période intermédiaire dans l'étang de Soustons où les variations de température sont plus faibles a été mise en évidence.

On a montré également le rôle d'écran que jouait l'eau vis-à-vis de la vase, principalement dans l'étang de la Rouillie ainsi que la moindre

sensibilité de la vase aux variations de température.

Les deux étangs, bien que différents par leur position géographique donc par leur condition climatique , leur substrat, et leur richesse en bactéries, présentent vis-à-vis du cycle de l'azote des phénomènes de même allure. Il semble donc que l'étang crée ses propres conditions de milieu qui sont relativement semblables pour tous les étangs.

Les problèmes du cycle de l'azote apparaissent dans cette étude et sont en relation avec la physiologie de la nitrification et de la décomposition de la matière organique.

L'azote nitrique, dont le comportement diffère suivant qu'on se trouve dans la vase ou dans l'eau nous a paru nécessiter une étude approfondie quant à son devenir.

La production de l'azote ammoniacal en relation avec la nature de la matière organique et la richesse en bactéries ammonifiantes permettra d'expliquer le paradoxe apparent de l'opposition entre le nombre de germes ammonifiants et la teneur en azote ammoniacal.

L'existence de la nitrification hétérotrophe associée à la nitrification autotrophe classique est suggérée ; il nous a semblé indispensable d'étudier expérimentalement les conditions de la nitrification dans les milieux aquatiques.

DEUXIEME PARTIE

DYNAMIQUE DE CERTAINS CHAINONS DU CYCLE DE L'AZOTE

xxxxxxxxxxxxxxx

L'étude écologique des vases d'étangs nous confirme le rôle très important joué par l'azote sous toutes ses formes dans l'évolution des écosystèmes aquatiques. Les problèmes essentiels qui se dégagent ont trait à la nature même du milieu aquatique : les cycles biologiques dans la vase ont lieu en grande partie à l'obscurité et en présence de faibles quantités d'oxygène ; dans certaines vases, particulièrement putrides, l'oxygène est pratiquement absent.

Dans les vases comme dans les sols, les microorganismes hétérotrophes jouent un double rôle : ils sont à la fois producteurs d'azote minéral à partir d'azote organique et producteur d'azote organique à partir d'azote minéral, en même temps que les végétaux supérieurs. Cependant, dans les vases, où ces derniers ont une importance beaucoup plus faible que dans les sols, la plus grande partie de l'azote minéral est réorganisée par les algues et les bactéries. Au sein des sols enfin, la transformation de l'azote ammoniacal en azote nitrique se présente comme un phénomène tellement général que l'azote nitrique est considéré comme la forme stable de l'azote minéral.

Dans le cas où nous sommes en présence d'un milieu peu aéré, on pourrait penser a priori que l'existence des nitrates serait précaire, que la nitrification se ferait difficilement et que l'azote minéral se trouverait plutôt sous forme ammoniacale.

Compte tenu de ces remarques, nos recherches se situent au niveau du devenir de l'azote nitrique dans l'eau et la vase, de la minéralisation de la matière organique de la vase, de la nitrification autotrophe et hétérotrophe, en recherchant pour cette dernière les micro-organismes qui en sont responsables et enfin de l'étude des gaz dégagés par les vases. Cette dernière étude a été entreprise de façon à tenter d'expliquer les déficits d'azote trouvés dans les bilans établis dans les travaux précédents.

CHAPITRE I

ETUDE EXPERIMENTALE DU DEVENIR DE L'AZOTE NITRIQUE DANS L'EAU

xxxxxxxxxx

L'azote nitrique est considéré classiquement dans les sols comme une forme stable de l'azote minéral. Dans les milieux aquatiques où dominent les conditions réductrices, nous nous sommes demandé s'il en était de même.

A - PROTOCOLE DES ESSAIS

Trois types d'expériences ont été envisagés pour répondre à ces questions. Le protocole des essais était présenté dans la partie "Matériel et Méthodes" (fig. 3) ; nous le rappelerons brièvement ici :

Dans un premier temps, nous avons voulu connaître l'évolution de la teneur en azote nitrique ajouté à l'eau d'un étang, en fonction de l'activité photosynthétique. Pour cela, nous avons disposé 2 séries de 4 bacs, dont l'une est placée à la lumière, l'autre à l'obscurité. Dans chaque série, deux bacs reçoivent de l'eau distillée, ils servent alors de témoins, et les deux autres bacs reçoivent de l'eau de source enrichie en nitrate de calcium (10 ml/1^{-1} de N NO_3). L'établissement de l'équilibre entre la vase et l'eau est vérifié par dosage des formes de l'azote dans l'eau ; on ajoute ensuite $(NO_3)2$ Ca et on continue à doser les formes de l'azote dans l'eau des bacs. En fin d'expérience, on a dosé les formes de l'azote dans la couche superficielle de la vase pour tenter d'évaluer l'importance des échanges vase-eau.

Pour situer les données de la chimie à celle de la biologie, on a, d'une part dénombré les bactéries dénitrifiantes dans quatre des huit bacs, et, d'autre part dosé l'azote aminé pouvant provenir de la réorganisation de l'azote minéral introduit.

Ensuite, de manière à nous rendre compte de l'influence de la vase dans le comportement de l'ion nitrate ajouté à l'eau, nous avons disposé 2 séries de 6 flacons. Une série contient uniquement l'eau de l'étang accompagnée de nitrate de calcium (8,4 mg/l^{-1}) ; l'autre série reçoit en plus 10 g de vase fraîche.

Dans la première série, on effectue les dosages sur un flacon, au bout de 30 jours, et sur les cinq autres, au bout de 64 jours.

Dans la deuxième série , sur un flacon, l'azote minéral est dosé au bout de 30 jours dans la vase et dans l'eau, puis au bout de 64 jours, dans les 5 flacons restants, on fait un dosage d'azote total dans la vase et l'eau pour évaluer la réorganisation de l'azote minéral.

Enfin, un bac sans fond est placé dans l'étang du Miroir et l'eau de ce bac est enrichie en $(NO_3)_2Ca$ pour tenter d'avoir une idée des phénomènes en conditions semi-naturelles ; on dose ensuite l'azote ammoniacal et nitrique dans l'eau du bac et de l'étang et, à la fin de l'essai, les formes de l'azote dans la partie superficielle de la vase. Pour préciser les conditions d'oxydo-réduction, on a fait des mesures de potentiel "redox" dans les carottes prélevées dans le bac sans fond et dans l'étang.

B - ESSAIS EN BACS

La vase ayant servi aux essais en bacs et "in vitro" provient de l'étang du Paraclet déjà décrit. Sa composition est présentée dans le tableau XIV. On observe la richesse de cette vase en matière organique et azote total, et sa pauvreté en azote ammoniacal et nitrique. Il s'agit donc d'un milieu où la minéralisation de l'azote est peu active.

Matière sèche	22,7	%	de la vase égouttée
Matière organique	30,5	%	de la matière sèche
Carbone organique	120	g	par kg de matière sèche
Azote total	10,40	g	"
Azote ammoniacal	3,5	mg	"
Azote nitrique	3,5	mg	"
Soufre	460	mg	"
Fer	10	g	"
Sodium	195	mg	"
Potassium	244	mg	"
Calcium	15,1	g	"
Magnésium	0,41	g	"

Tableau XIV - Composition de la vase utilisée pour les essais au laboratoire (dans les bacs et "in vitro").

1) Evolution des nitrates

Nous avons porté sur le tableau XV les résultats de la première série des dosages effectués périodiquement sur l'eau des 8 bacs en expérience, entre 2 et 9 semaines, jusqu'à ce que les variations devenues faibles révèlent un certain équilibre.

Nous constatons que l'azote ammoniacal est passé en solution en plus grande quantité dans l'eau distillée que dans l'eau de source 14 jours après la mise en place. Après cette date, l'azote nitrique augmente dans l'eau distillée, puis se stabilise alors que l'azote ammoniacal diminue tandis que l'un et l'autre diminuent assez rapidement dans l'eau de source. Pratiquement, en un mois, les eaux sont arrivées à leur état d'équilibre avec la vase et il n'y a plus que de faibles différences pour la teneur en azote minéral entre les deux sortes d'eaux ; c'est dans les bacs maintenus à la lumière que les différences semblent persister le plus longtemps.

Les mesures effectuées après adjonction des nitrates, c'est-à-dire 62 jours après la mise en place des bacs, figurent dans le tableau XVI. On constate que l'azote nitrique introduit disparaît très rapidement de l'eau des bacs. Pratiquement, après 25 jours, les teneurs sont retombées au niveau existant avant l'apport artificiel de nitrate.

Malgré de petites variations difficilement explicables, il semble bien qu'une partie des nitrates ajoutés ait disparu en passant par le stade nitrite, mais sans la moindre formation d'azote ammoniacal. Il s'agirait donc bien ici d'une dénitrification désassimilatrice constatée dans les sols par WOLDENDORP (1965), c'est-à-dire aboutissant à une perte d'azote pour le milieu.

2) Dénombrement des germes dénitrifiants

La disparition des nitrates peut être expliquée en considérant le tableau XVII où figurent les résultats de la numération des germes dénitrifiants présents dans l'eau des quatre bacs. Dans le bac 3, la microflore dénitrifiante a augmenté dans la proportion de 1 à 10 par rapport au bac 1

Nombre de jours depuis le début de l'expérience			14			22			36			49			62		
Formes de l'azote dosées			minéral	ammoniacal	nitrique et nitreux	minéral	ammoniacal	nitrique et nitreux	minéral	ammoniacal	nitrique et nitreux	minéral	ammoniacal	nitrique et nitreux	minéral	ammoniacal	nitrique et
à la lumière	eau distillée	Bac 1 36,1 l	0,62	0,44	0,18	0,46	0	0,46	0,50	0	0,50	0,45	0	0,45	0,45	0	0,45
		Bac 2 34,9 l	0,61	0,45	0,16	0,42	0,05	0,37	0,45	0	0,45	0,44	0	0,44	0,45	0	0,45
	eau de source	Bac 3 31,3 l	1,90	0,18	1,71	0,67	0	0,67	0,59	0	0,59	0,61	0	0,61	0,55	0	0,55
		Bac 4 35,0 l	1,92	0,28	1,64	0,67	0,05	0,62	0,56	0	0,56	0,61	0	0,61	0,56	0	0,56
à l'obscurité	eau distillée	Bac A 33,6 l	0,67	0,44	0,23	0,84	0,16	0,68	0,45	0	0,45	0,45	0	0,45	0,50	0	0,50
		Bac B 33,6 l	0,67	0,50	0,17	0,80	0,11	0,69	0,50	0	0,50	0,50	0	0,50	0,50	0	0,50
	eau de source	Bac C 31,2 l	1,62	0,21	1,81	1,56	0,05	1,51	0,60	0	0,60	0,50	0	0,50	0,50	0	0,50
		Bac D 40,8 l	2,02	0,21	1,81	1,56	0,05	1,51	0,60	0	0,60	0,50	0	0,50	0,50	0	0,50

Tableau XV - Evolution des teneurs en azote minéral (mg/l) dans l'eau surmontant la vase des bacs en expérience. Teneurs précédant l'apport de nitrate. Le volume d'eau présent en l est précisé pour chaque bac.

Nombre de jours après adjonction de nitrates			3				11				18				25				33				49			
Formes de l'azote dosées			minéral	ammoniacal	nitreux	nitrique	minéral	ammoniacal	nitreux	nitrique	minéral	ammoniacal	nitreux	nitrique	minéral	ammoniacal	nitreux	nitrique	minéral	ammoniacal	nitreux	nitrique	minéral	ammoniacal	nitreux	nitrique
à la lumière	Eau distillée	Bac 1 (témoin)	0,44	0	0,01	0,43	0,39	0	0,10	0,29	0,39	0	0,005	0,38	0,40	0	0,000	0,40	0,40	0	0,07	0,33	0,44	0	0,050	0,39
		Bac 2 (témoin)	0,67	0	0,04	0,63	0,50	0	0,20	0,30	0,39	0	0,13	0,26	0,39	0	0,14	0,25	0,42	0	0,08	0,34	0,46	0	0,150	0,31
	Eau de source	Bac 3 (avec NO_3^-)	7,73	0	0,09	7,64	3,60	0	0,53	3,07	1,40	0	0,17	1,23	1,12	0	0,26	0,86	0,70	0	0,28	0,42	0,74	0	0,000	0,74
		Bac 4 avec NO_3^-	7,84	0	0,56	7,28	3,80	0	0,17	3,63	1,56	0	0,15	1,41	1,00	0	0,29	0,71	0,67	0	0,25	0,42	0,72	0	0004	0,72
à l'obscurité	Eau distillée	Bac A (témoin)	0,39	0	0,17	0,22	0,40	0	0,19	0,21	0,39	0	0,12	0,27	0,39	0	0,00	0,39	0,42	0	0,16	0,26	0,50	0	0,16	0,34
		Bac B (témoin)	0,84	0	0,15	0,69	0,45	0	0,13	0,32	0,40	0	0,10	0,30	0,42	0	0,08	0,34	0,42	0	0,05	0,37	0,50	0	0,00	0,50
	Eau de source	Bac C avec NO_3^-	6,83	0	0,42	6,41	3,32	0	0,65	2,67	1,32	0	0,33	0,99	0,84	0	0,16	0,68	0,59	0	0,12	0,47	0,62	0	0,02	0,60
		Bac D avec NO_3^-	6,98	0	0,01	6,97	4,31	0	0,24	4,07	2,45	0	0,01	2,44	1,34	0	0,02	1,32	0,62	0	0,00	0,62	0,70	0	0,00	0,70

Tableau XVI - Evolution des teneurs en azote minéral (mg/l) dans l'eau surmontant la vase des bacs en expérience après l'addition de 10 mg/l d'azote nitrique dans cette eau.

	à la lumière	à l'obscurité
TEMOIN	Bac 1 : 8.000 germes	Bac A : 25.000 germes
Eau enrichie en nitrate	Bac 3 : 80.000 germes	Bac C : 850.000 germes

Tableau XVII - Influence de la lumière et de l'apport de nitrate de calcium sur le nombre de germes dénitrifiants présents dans l'eau des bacs, 49 jours après cet apport.
(le nombre de germes est donné par millilitre d'eau).

et de 1 à 34 dans le bac C par rapport au bac A.

D'autre part, les recherches de NH_4^+ dans les différents tubes de dilution utilisés pour les dénombrements, ont toujours été négatives ; on s'explique bien aussi l'absence d'azote ammoniacal constatée précédemment dans les bacs. L'introduction des nitrates est donc suivie d'une disparition rapide et d'une prolifération importante des germes dénitrifiant ce qui confirme les observations déjà effectuées par RODINA (1958) lors de l'introduction en étang d'engrais nitriques. Cette disparition de nitrates de l'eau peut également être due à une réorganisation sous forme d'acides aminés, on a des échanges avec la vase. Aussi, nous avons dosé les acides aminés dans l'eau des bacs, et les formes de l'azote dans la vase.

3) Réorganisation de l'azote minéral

On a dosé, 49 jours après l'adjonction de nitrates l'azote aminé dans l'eau de chaque bac. Les résultats sont portés sur le tableau XVIII ; ils sont particulièrement intéressants bien que le nombre des essais ait été relativement réduit. On constate un gain important dans les bacs ayant reçu le nitrate de calcium, les bacs éclairés donnent même un rendement de 86 p. 100 de l'azote apporté, retrouvé en azote aminé à la fin des essais. Il semble donc bien que la réorganisation de l'azote soit à la fois le fait d'organismes hétérotrophes (bactéries) et d'organismes photosynthétiques.

4) Echanges entre la vase et l'eau

La diminution de l'azote organique dans le centimètre superficiel, 49 jours après l'apport de nitrates est mise en évidence à l'examen du tableau XIX. Elle est accompagnée d'une augmentation de la quantité d'azote minéral, ammoniacal et nitrique. Cette diminution d'azote organique semble être la conséquence d'une minéralisation active puisqu'elle porte uniquement sur l'azote organique, alors que les diverses formes de l'azote minéral ont au contraire assez nettement augmenté. Ce phénomène doit certainement beauco à l'oxygénation de la vase opérée lors de son homogénéisation avant sa mise en place dans les bacs.

	à la lumière			à l'obscurité		
Eau Distillée (témoin)	Bac 1	40,50 mg/1	Moyennes : 41,86	Bac A	42,20 mg/1	Moyennes : 41,01
	Bac 2	43,22 mg/1		Bac B	39,83 mg/1	
Eau de source (avec nitrate ajouté)	Bac 3	48,40 mg/1	50,05	Bac C	49,20 mg/1	47,23
	Bac 4	51,70 mg/1		Bac D	45,26 mg/1	
	Gain moyen avec l'engrais nitrique		8,19 mg/1	Gain moyen avec l'engrais nitrique		6,22 mg/1

Tableau XVIII - Influence de l'apport d'azote sur l'augmentation de la teneur en acides aminés (exprimés comme azote de la glycine) consécutive à l'adjonction de nitrate de calcium dans l'eau des quatre bacs : 3,4,C et D.

Formes de l'azote			1 Azote total (en g)	2 Azote ammoniacal (en mg)	3 Azote nitreux (en mg)	4 Azote nitrique (en mg)	5 = 2+3+4 Azote minéral (en mg)	6 Azote organique (en g)	7 Azote aminé (en mg)
vase au début de l'expérience			10,40	3,5	0	3,5	7	10,393	Non dosé
à la lumière	Eau distillée (témoin)	Bac 1	6,86	44,4	3,2	44,6	92,2	6,7678	2,3
		Bac 2	6,65	46,2	3,8	48,5	98,5	6,5515	1,98
	Eau de source (avec nitrate)	Bac 3	6,79	51	3,4	45,4	99,8	6,6902	1,75
		Bac 4	7,28	52,1	4,2	46,9	103,2	7,1768	1,09
à l'obscurité	Eau distillée (témoin)	Bac A	9,24	63,25	4,21	56,55	124	9,116	2,01
		Bac B	10,05	51,48	3,9	64,12	119,5	9,9305	1,95
	Eau de source (avec nitrate)	Bac C	9,15	64,53	4,35	60,12	129	9,021	2,07
		Bac D	9,24	74,5	4,06	14,59	93,15	9,1468	1,68

Tableau XIX - Evolution des teneurs en composés azotés du centimètre superficiel de la vase de chaque bac au début et à la fin de l'expérience d'adjonction des nitrates (10 mg. d'azote nitrique par 1 d'eau).

Les valeurs, en poids, sont donnés par kilogramme de matière sèche.

C - EXPERIENCES "IN VITRO"

Ces recherches ont été menées dans le but de connaître l'influence de la vase sur le comportement des nitrates. Les résultats sont regroupés dans le tableau XX présentant les deux séries de flacons de verre, l'une ayant reçu l'eau de l'étang et les nitrates et l'autre, l'eau, les nitrates et la vase.

Les chiffres montrent une faible variation des formes de l'azote de l'eau dans la première série, et une migration importante de l'azote de l'eau vers la vase dans la deuxième série. Cette migration a lieu principalement pour la forme organique; ceci est très probablement dû à l'accumulation de cadavres de microbes (au sens large) sur le fond des flacons. Malgré les précautions prises, le milieu se trouve différent de ceux réalisés dans les bacs, et l'azote organique n'est pas minéralisé ici.

D - ETANG

L'installation d'un bac sans fond dans l'étang avait pour but de connaître le devenir des nitrates dans des conditions très proches des conditions naturelles.

1) Les données chimiques et microbiologiques

Dans le tableau XXI ont été portés les résultats des dosages de l'azote dans l'eau de l'étang et du bac sans fond qui y était placé ; au départ, les teneurs sont évidemment identiques.

Nous notons que les teneurs en azote minéral et en azote nitrique baissent assez régulièrement dans le bac alors que dans l'étang, après une baisse au début des essais, elles se maintiennent ensuite vers la fin des mesures aux environs de 3 mg/litre. L'azote ammoniacal, présent en faible quantité, au départ, dans l'eau de l'étang et du bac (0,14 mg/l^{-1}), disparaît très rapidement et complètement dans le bac.

Formes de l'azote		1 Azote organique			2 Azote minéral			3 = 1 + 2 Azote total		
Nombre de jours		0	30	64	0	30	64	0	30	64
1er série de flacons (Eau + 4,2 mg N_{NO_3} -)		7,27	7,22	7,22	6,33	6,18	6,18	13,60	13,30	13,3
ème série de flacons	Eau	8,51	—	—	6,74	6,38	—	15,25	—	1,8
u+vase+ 4,7mg N_{NO_3} -)	Vase	3,81	—	—	0,21	0,36	—	4,02	—	15,8

Tableau XX - Evolution des teneurs en azote organique et minéral dans les deux séries de flacons de verre, l'une comportant eau et nitrates, l'autre eau + vase + nitrates.

Formes de l'azote / Nombre de jours	Etang	Bac sans fond après avoir ajouté environ 2,5 mg/l d'azote nitrique dans le bac.		
	1 Azote minéral (nitrique + ammoniacal)	2 Azote ammoniacal	3 Azote nitrique	4 = 2 + 3 Azote minéral
Le jour de la mise en place du bac :				
0	5,04	0,14	4,90	5,04
1	-	0,14	7,34	7,48
8	-	0	6,16	6,16
15	-	0	4,66	4,66
30	3,5	0	3,64	3,64
45	3,64	0	3,09	3,09
60	3,64	0	2,24	2,24
75	4,21	0	2,30	2,30
90	4,48	0	1,96	1,96
105	4,20	0	1,72	1,72
120	2,80	0	1,06	1,06
135	2,80	0	0,87	0,87
150	3,26	0	0,56	0,56
158	3,36	0	0,62	0,62
173	3,36	0	0,56	0,56
188	2,68	0	0,34	0,34

Tableau XXI - Evolution des teneurs en azote minéral (mg/l) dans l'eau de l'étang et du bac sans fond qui y a été placé.

On constate (tableau XXII) que la vase du bac s'est trouvée fortement appauvrie en azote total par rapport à celle de l'étang, probablement parce qu'à l'intérieur de l'enceinte règnent des conditions différentes de celles de l'extérieur.

Dans l'eau du bac sans fond, on trouve 13.000 germes dénitrifiants par ml, et comme dans le cas des essais en bacs, l'azote ammoniacal n'est jamais décelé dans les diverses dilutions. L'azote restant dans la vase du bac est uniquement sous forme organique ; or, la minéralisation existe puisque l'azote organique restant est à un taux très inférieur à celui de la vase de l'étang ; donc l'azote minéral formé dans le bac est très rapidement réorganisé ou entrainé par les eaux de pluie, car on n'en trouve pas trace à l'analyse.

Pour expliquer les variations de l'azote dans l'étang lui-même, il faut tenir compte de l'intervention de deux phénomènes annexes : l'un consistant en l'apport continu d'une eau contenant 5 mg/l en moyenne d'azote nitrique provenant de deux sources qui débitent directement dans l'étang, et l' autre par la forte pluviosité, anormalement élevée, de la période pendant laquelle les essais ont eu lieu. Cette pluviosité ayant manifestement dépassé l'évaporation, on pouvait voir parfois, dans le bac sans fond, le niveau de l'eau surmonter de 1 à 2 cm celui existant autour, maintenu constant par le déversoir de l'étang. L'équilibre devait se rétablir, en grande partie par diffusion de l'eau à travers la vase, dans le sens du bac vers l'extérieur, ce qui ne pouvait que diminuer davantage la teneur en azote du bac de façon beaucoup plus sensible que dans l'étang. On peut également envisager l'existence d'un phénomène analogue à une lixiviation, entraînant l'azote minéral vers les couches plus profondes de la vase.

Une végétation dense d'algues filamenteuses, formant une fleur d'eau typique, s'est également développée pendant la fin de l'expérience. Dans l'étang, on la trouve formée essentiellement par Zygnema sp, avec de nombreux Spirogyra sp.associés, tandis que dans le bac, le genre Spirogyra est seul abondamment représenté en dehors de quelques exemplaires d'algues diverses accompagnatrices (Cosmarium, Cymbella, etc...).

	Bac sans fond	Etang
Azote ammoniacal	0	0
Azote nitreux	0	0,03
Azote nitrique	0	0,14
Azote minéral	0	0,17
Azote organique	4070	7049
Azote total	4070	7050

Tableau XXII - Teneur en azote de la couche superficielle de la vase dans l'étang et à l'intérieur du bac sans fond à la fin des essais.

(résultats donnés en mg par kg de matière sèche)

2) Potentiel "Redox"

Dans le bac sans fond et dans l'étang, des carottes de vase et d'eau sont prélevées et les Eh et pH sont mesurés, de façon à préciser dans quelles conditions d'oxydo-réduction s'effectuent les transformations de l'azote nitrique.

Sur le graphique 26, représentant les résultats des mesures du pH et du Eh dans les carottes prélevées dans le bac et dans l'étang, l'axe des ordonnées indique le niveau de l'interface et des différentes couches de la vase et de l'eau. L'axe des abscisses indique le potentiel "redox" en volts.

Les valeurs du pH, indiquées sur la figure, et mesurées dans l'eau immédiatement au-dessus de la vase, indiquent un milieu assez basique dans le bac, alors qu'il ne l'est que faiblement dans l'étang.

En ce qui concerne le Eh, on voit ici que, même vers 3 à 4 centimètres de profondeur dans la vase, où le potentiel "redox" est le plus bas, les valeurs trouvées ne sont pas, d'une façon générale, fortement réductrices, ne passant qu'une fois nettement au-dessous de Eh = 0,200 volts,potentiel de réduction du fer. La microzone superficielle est toujours à considérer comme fortement oxydée et elle permet donc les échanges entre la vase et l'eau (MORTIMER, 1941). Il n'existe pas de différence nette entre la courbe du bac sans fond et celle de l'étang.

E - SYNTHESE DES RESULTATS

L'azote nitrique ajouté à l'eau des bacs a disparu rapidement; l'apport de nitrates entraîne pour l'eau à la fois un gain en acides aminés, plus important à la lumière qu'à l'obscurité; on peut expliquer ce fait par la présence des algues favorisées par la lumière qui produiraient des acides aminés à partir de l'azote nitrique.

On note également une augmentation du nombre de germes dénitrifiants.

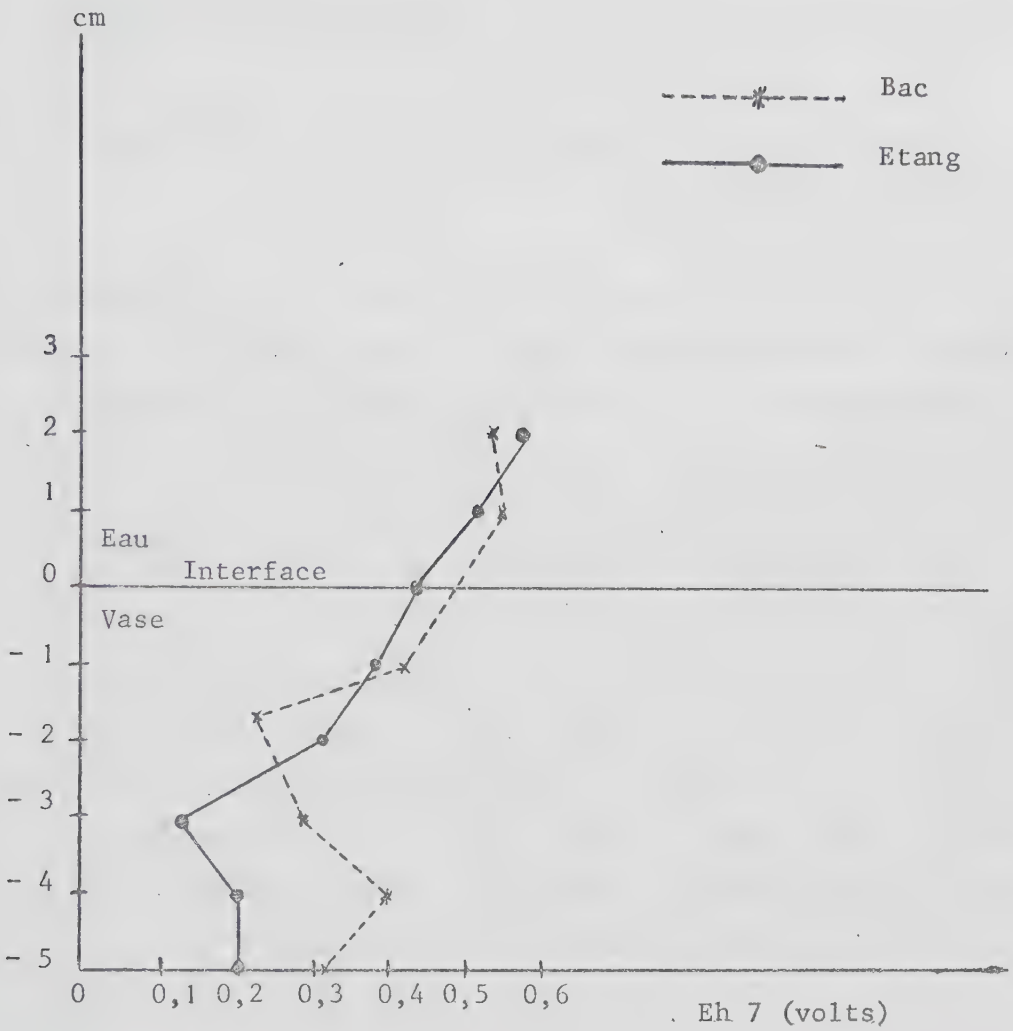


Figure 26 - Valeur du Eh^7 mesuré dans des carottes prélevées simultanément en fin d'expérience, dans le bac sans fond et dans l'étang à proximité du bac.

Le niveau le plus réducteur est situé à 2 cm de profondeur, sous l'interface vase-eau, dans le bac et à 3 cm dans l'étang.

pH de l'eau du bac : 9,35 pH de l'eau de l'étang : 7,7

Ces derniers sont certainement responsables de la transformation des nitrates en azote gazeux dans l'eau ; en présence de vase, l'azote nitrique migre vers la vase puis est réorganisé ou subit également la dénitrification désassimilatrice : on a en effet observé, lors des prises de carottes en étang et dans le bac sans fond, un dégagement assez important de bulles gazeuses en provenance des couches situées vers 10 cm de profondeur dans la vase ; la situation des poches gazeuses était facile à localiser sur les carottes extraites, renfermées dans un tube de plexiglass transparent.

L'azote gazeux de dénitrification ou de désassimilation, resté dans la vase, se dissout dans l'eau ou s'échappe dans l'atmosphère ; il constitue une source d'imprécisions dans les bilans d'azote. En outre, la plupart des phénomènes intéressant l'azote se déroulant dans la vase, il est nécessaire de tenir compte, en plus des dégagements gazeux de la vase, de la minéralisation de la matière organique et de la nitrification dans ce milieu.

CHAPITRE II

DECOMPOSITION DE LA MATIERE ORGANIQUE DANS LA VASE

xxxxxxxxxxx

Nous avons vu l'importance des problèmes de minéralisation-réorganisation dans l'étude du devenir de l'azote nitrique.

Nous avons voulu faire des bilans d'azote à partir de la matière organique présente initialement dans la vase en tenant compte des échanges entre la vase et l'eau et de l'activité des bactéries ammonifiantes. Pour avoir une vue nette des phénomènes, nous avons ajouté à la vase des substances d'origine végétale : d'une part, de la poudre de luzerne, riche en azote et comportant donc des protéines facilement décomposables par la microflore ammonifiante et, d'autre part de la poudre de feuilles de chêne, beaucoup moins riche en azote et contenant une grande proportion de tannins. Les vases enrichies, issues de l'étang de la Rouillie, sont placées dans les bacs et recouvertes d'eau.

Le bac n°1 est enrichi en poudre de luzerne, le bac n°2 en poudre de feuilles de chêne, le bac n°3 constitue le témoin.

Les formes de l'azote sont dosées dans l'eau périodiquement pendant 50 jours et, dans la vase, le premier et le cinquantième jour. On a effectué également des dénombrements de germes ammonifiants dans la vase et dans l'eau au premier, au seizième et au cinquantième jour et on a dressé les courbes d'activité ammonifiante au 16ème jour dans l'eau et la vase des trois bacs.

A - ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

Les résultats sont donnés en pourcentage de saturation, pour l'oxygène dissous dans l'eau, en mg/l pour les formes de l'azote dans l'eau, en mg/kg de matière sèche pour les formes de l'azote dans la vase.

1) L'eau

Les tableaux n° XXIII, XXIV, XXV rassemblent les résultats des mesures et dosages dans l'eau des bacs. Les points suivants peuvent être soulignés :

Oxygène dissous

Dans le bac n°1, le pourcentage de saturation baisse très rapidement jusqu'au onzième jour pour remonter avec quelques fluctuations, à 27 p. 100 au bout de 50 jours ; dans le bac n°2, la baisse est moins accusée, mais la remontée moins rapide puisqu'après 50 jours, le taux de saturation atteint 11 pour cent.

Dans les bacs témoins, le pourcentage de saturation reste à peu près constant. Il est proche de 35 pour cent pendant toute la durée de l'expérience.

Le pH change peu au cours de l'expérience ; on peut toutefois noter dans les bacs n°1 et 2 une très légère tendance à l'acidification qui peut provenir de la présence des acides organiques libérés par le résultat de la métabolisation de la luzerne et des feuilles de chêne.

Le rH varie à peu près dans le même sens que le pourcentage de saturation en oxygène.

Les teneurs en azote ammoniacal et nitrique, jusqu'au onzième jour de l'expérience, sont faibles et ont des valeurs voisines dans les trois bacs. Ceci correspond, sans doute, à la phase de mise en équilibre du milieu et d'échanges physico-chimiques entre la vase et l'eau, comme

Temps en jours	0	1	4	8	11	15	19	22	27	30	35	50
O_2 (% saturation	89	3,8	4,1	5	4,5	18	15	8,2	18	21	27	27
pH	7,6	7,5	7,4	7,3	7,4	7,6	7,5	7,2	7,5	7,6	7,6	7,6
rH_2	31	30	28	27	26	29	30	28,6	28	29	28	29
$N_{NH_4^+}$	0,24	0,35	0,11	0,32	0,57	1,20	2,16	2,70	3,30	4,01	4,30	4,72
$N_{NO_3^-}$	0,008	traces	0,05	0,20	0,21	0,34	0,08	0,11	0,20	0,10	0,12	0,18
$N_{NO_2^-}$	traces	0,0083	traces	0,0017	0,0025	0,0060	0,0100	0,0330	0,0970	0,2100	0,2100	0,4300
$N_{org.}$	0,40	1,3	3,2	4,4	1,9	1,75	2,2	1,3	1,5	1,3	0,98	0,90

Tableau XXIII - Evolution des caractères physico-chimiques et chimiques de l'eau du bac n°1 entre le début (0 jour) et la fin (50ème jour) de l'expérience. Les teneurs sont données en mg d'azote par litre d'eau.

emps en jours	0	1	4	8	11	15	19	22	27	30	35	50
$_2$ (% saturation)	89	2	8	10	11	10,5	9	10	8,5	9	10	11
pH	7,6	7,4	7,5	7,1	7	7,2	7,3	7,4	7,1	7,2	7,6	7,4
rH_2	35	29	30	27	26	29	31	30	24	28	26	26
N_{NH4^+}	0,24	0,29	0,35	0,46	0,60	0,80	0,87	1,80	1,90	2,01	2,30	2,42
$N_{NO_3^-}$	0,08	traces	traces	0,05	traces	0,02	0,045	traces	0,01	traces	traces	0,045
$N_{NO_2^-}$	traces	néant	néant	traces	néant	traces	néant	néant	traces	traces	néant	néant
$N_{org.}$	0,40	0,90	1,30	3,21	2,58	3,47	2,12	2,20	1,95	0,98	1,21	0,97

Tableau XXIV - Evolution des caractères physico-chimiques et chimiques de l'eau du bac n°2 entre le début (0 jour) et la fin (50ème jour) de l'expérience. Les teneurs sont données en mg d'azote par litre d'eau.

emps en ours	0	1	4	8	11	15	19	22	27	30	35	50
(% saration)	89	31	32	37	35	30	26	32	35	35	35	35
pH	7,6	7,5	7,6	7,5	7,6	7,6	7,6	7,5	7,5	7,5	7,6	7,6
rH_2	31	30	30	29,5	30	31	30	29	29	29	20	29
$N_{NH_4^+}$	0,124	0,18	0,20	0,21	0,40	0,45	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
$N_{NO_3^-}$	0,08	0,08	traces	0,12	0,12	0,23	0,62	1,61	1,53	1,20	0,90	0,70
$N_{NO_2^-}$	traces	traces	traces	traces	0,020	0,060	0,140	0,020	traces	traces	0,015	0,015
$N_{org.}$	0,40	0,40	0,70	0,40	0,55	0,70	0,40	0,40	0,45	0,65	0,45	0,45

Tableau XXV - Evolution des caractères physico-chimiques et chimiques de l'eau du bac n°3 entre le début (0 jour) et la fin (50ème jour) de l'expérience. Les teneurs sont données en mg d'azote par litre d'eau.

nous l'avons vu dans le chapitre précédent. Ensuite l'ammonification sous l'action des microorganismes se fait sentir :

a) dans le bac n°1, la teneur ne N_{NH_4}+ augmente rapidement du 18ème jour au 50ème jour pour atteindre une valeur assez importante (elle est multipliée par 8). Du fait de la faiblesse du taux de saturation en oxygène, la nitrification devrait mal s'accomplir ce qui pourrait expliquer l'accumulation des sels ammoniacaux, ou leur réorganisation comme l'indique la valeur relativement élevée de N organique ; la teneur en azote nitrique croît légèrement ;

b) dans le bac n°2, on observe des phénomènes de même intensité que dans le bac n°1, mais atténués. Entre le 18ème et le 50ème jour, la teneur en N_{NH_4}+ est multipliée par 4 ; la nitrification est alors pratiquement absente ;

c) dans le bac témoin, où la microflore ammonifiante est peu favorisée, le taux de l'azote ammoniacal se maintient constamment à un niveau faible ; la teneur en azote nitrique est multipliée par 6 entre le 18ème et le 50 ème jour.

La teneur en sels nitreux est souvent basse. Cependant, des valeurs notables sont atteintes dans le bac n°1 lorsque la teneur en N_{NH_4}+ est forte et quand le pourcentage de saturation commence à remonter ; il pourrait s'agir du premier stade de la nitrification.

L'azote organique, dans des bacs enrichis, présente des variations en dents de scie au cours de l'expérience ; l'allure de ces variations est semblable dans le bac n°1 et le bac n°2, alors que dans le témoin, la teneur en azote organique varie très peu et reste à un niveau inférieur à celui des 2 autres bacs. L'augmentation observée dans les bacs n°1 et 2 pourrait provenir de la diffusion dans l'eau des substances végétales ajoutées aux vases.

La figure 27 montre l'allure des dégagements de NH_4^+, en fonction du temps, dans l'eau des trois bacs ; le dégagement d'azote ammoniacal

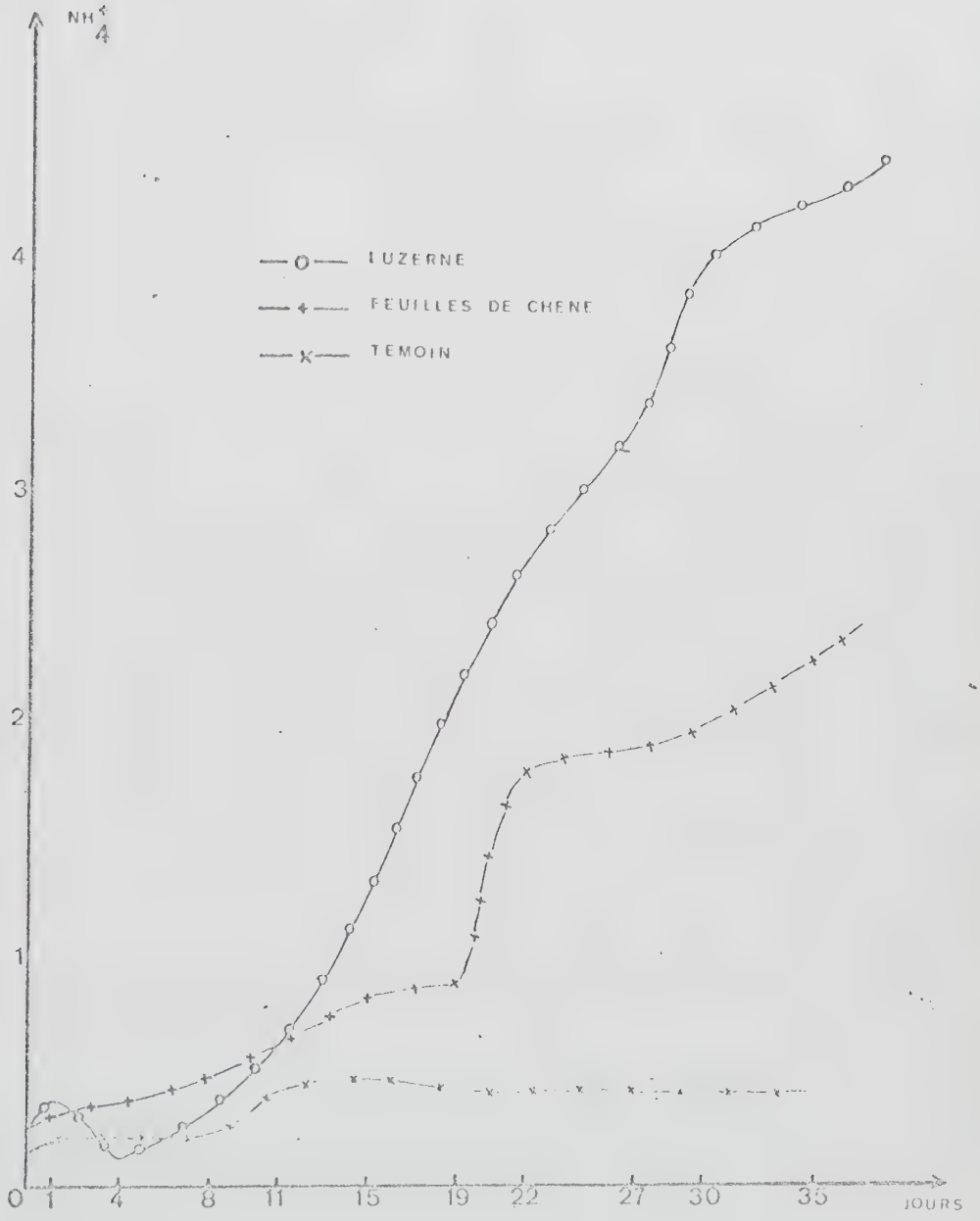


Fig. 27 - Evolution de la teneur en azote ammoniacal, en mg de N NH_4^+ par 1 d'eau, en fonction du temps, dans l'eau des trois bacs.

semble en rapport avec la nature et la quantité de matière organique de la vase. Pendant les 11 premiers jours, le dégagement est très faible et correspond à la mise en équilibre du milieu. Ensuite l'ammonification s'effectue sous l'action des microorganismes, elle est importante dans le bac n°1 enrichi en substance à rapport C/N égal à 10, moindre dans le bac n°2 enrichi en substance à rapport C/N égal à 33 et faible dans le bac témoin (C/N = 13). Ces résultats confirment ceux trouvés dans les sols enrichis en substances organiques de rapports C/N différents (POCHON,1958).

2) La vase

Les résultats des dosages dans les vases de chaque bac, présentés sur le tableau XXVI, révèlent que la teneur en NH_4^+ s'élève à mesure que les teneurs en azote et carbone organique diminuent. Le rapport C/N augmente dans le bac n°1 et reste constant dans les bacs n°2 et 3. Le taux d'ammonification (notion introduite par GEHU et GHEZTEM, 1965) qui est égal à $(N_{NH_4}+/N_{total})x100$, passe de 0,15 à 1,3 dans le bac n° 1, de 0,23 à 0,5 dans le bac n° 2 et de 0,24 à 0,83 dans le bac n° 3. Dans le bac n° 1, l'ammonification est la plus importante ; par contre, le bac n° 3 possède un taux plus fort que le bac n° 2. Le taux d'ammonfication augmente avec le temps dans les trois bacs et est maximum dans le bac avec la luzerne.

B - LES BILANS D'AZOTE

Il paraît intéressant, quelles que soient les imprécisions inévitables dans ce type d'expérience, d'essayer de faire un rapport entre l'azote présent initialement dans les bacs et l'azote apparu en supplément de l'azote initial dans l'eau et la vase ; l'azote organique disparu de la vase est comparé à l'azote retrouvé dans l'eau et la vase sous forme organique et minérale ; nous pouvons, en effet, admettre que l'azote organique a été minéralisé en azote ammoniacal et que celui-ci a pu être en partie nitrifié et réorganisé dans la vase et l'eau ; dans le cas d'un déficit en azote nitrique,on ne tiendra pas compte de cette donnée, car il s'agirait alors d'une dénitrification en azote gazeux, qu'il n'est pas possible d'évaluer.

	bac enrichi en poudre de feuilles de luzerne n° 1		bac enrichi en poudre de feuilles de chêne, n° 2		bac témoin n° 3	
Temps en jours	0 (vase initiale après mélange)	50	0 (vase initiale après mélange)	50	0	50
$N_{NH_4^+}$	10	70	10	23,4	10	33
$N_{NO_3^-}$	7	1	7	2	7	2,2
$N_{NO_2^-}$	0,07	0,03	0,07	traces	0,07	traces
N total	6 800	5 450	5 200	4 720	4 100	4 030
C	75 200	68 500	78 100	62 500	53 300	52 900
C/N	11	12,5	14,5	14,5	13	13
taux d'ammonification $\frac{NH_4^+}{N\ total} \times 100$	0,15	1,3	0,23	0,5	0,27	0,83

Tableau XXVI - Caractéristiques chimiques et taux d'ammonification dans la vase des 3 bacs au début et à la fin (50 ème jour) de l'expérience. Les teneurs sont données en mg d'azote et de carbone par kg de matière sèche.

Les bilans sont effectués le 50 ème jour dans les 3 bacs.

1) Bac n° 1 : Poudre de luzerne

Evaluation de l'azote organique disparu de la vase

Poids de vase humide : 25 kg
Teneur en matière sèche : 30 p. 100
Poids en matière sèche : 25 x 0,3 = 7,5 kg
Azote organique initial en grammes : 6,8 x 7,5 = 51 g
Azote organique final : 5,45 x 7,5 = 40,87 g
Azote organique disparu : 51 - 40,87 = 10,13 g

Evaluation de l'azote apparu sous forme ammoniacale dans la vase, sous forme organique et minérale dans l'eau.

Azote organique dans l'eau : 0,5 mg x 60 = 30 mg
Azote ammoniacal, nitreux et
nitrique dans l'eau : (4,48 + 0,18 + 0,43) x 60 = 305 mg
Azote ammoniacal dans la vase : 7,5 x 60 = 450 mg
TOTAL : 450 + 305 + 30 = 785 mg = 0,785 g
Rapport : azote apparu / azote organique disparu : $\frac{0,785}{10,13}$ = 7,7 %

2) Bac n° 2 : Poudre de feuilles de chêne

Evaluation de l'azote organique disparu de la vase

Poids de vase humide : 25 kg
Teneur en matière sèche : 34 p. 100
Poids de matière sèche : 25 x 0,34 = 8,5 kg
Azote organique initial : 5,2 x 8,5 = 44,20 g
Azote organique final : 4,7 x 8,5 = 40,12 g
Azote organique disparu : 44,20 - 40,12 = 4,08

Evaluation de l'azote apparu sous forme minérale dans la vase, sous forme organique et minérale dans l'eau

Azote organique dans l'eau : 0,57 x 60 = 34 mg
Azote ammoniacal, nitreux et
nitrique dans l'eau : 2,18 x 60 = 132 mg
Azote ammoniacal dans la vase : 13,4 x 8,5 = 114 mg
TOTAL : 34 + 132 + 114 = 280 mg = 0,280 g
Rapport de l'azote apparu à l'azote organique
disparu : $\frac{0,28}{4,08}$ = 6,9 %

3) Bac n° 3 : Témoin

Evaluation de l'azote organique disparu de la vase

Poids de vase humide : 25 kg
Teneur en matière sèche : 28 p. 100
Poids en matière sèche : 25 x 0,28 = 7 kg
Azote organique initial : 4,100 x 7 = 28,700 g
Azote organique final : 4,030 x 7 = 28,210 g
Azote organique disparu : 28,700 - 28,210 = 0,490 g

Evaluation de l'azote apparu sous forme ammoniacal dans la vase, sous forme organique et minérale dans l'eau

Azote organique dans l'eau : 0,10 x 60 = 6 mg
Azote minéral dans l'eau : (0,38 + 0,62) x 60 = 60 mg
Azote ammoniacal dans la vase : 23 x 7 = 161 mg
TOTAL : 6 + 60 + 161 = 227 mg = 0,227 g
Rapport de l'azote apparu à l'azote organique
disparu : $\frac{0,227}{0,49}$ = 46 %

Au vu des rapports entre l'azote minéral récupéré (en y incluant l'azote organique apparu dans l'eau qui peut provenir d'une réorganisation de l'azote minéral dégagé de la vase) par rapport à l'azote organique initial de la vase, nous sommes frappés par la faible valeur des rapports pour les bacs n°1 et 2 ; une très petite partie de l'azote disparu de la vase a été retrouvée. Quand au bac n°3, témoin, près de la moitié de l'azote disparu est retrouvée. La faiblesse des rapports dans les deux bacs enrichis peut s'expliquer de différentes façons : l'azote ammoniacal serait rapidement réorganisé par les algues et les bactéries. Il pourrait également être nitrifié : l'azote nitrique suivant alors le même chemin que l'azote ammoniacal, ou étant dénitrifié en azote gazeux qui se dissout dans l'eau ou s'échappe dans l'atmosphère.

C - ETUDES MICROBIOLOGIQUES

1) Les résultats des dénombrements de germes ammonifiants dans l'eau et la vase nous montrent (tableau XXVII) des différences entre la vase et l'eau :

- Dans la vase :

Dans le bac n° 1, le nombre de germes a été multiplié par 100 entre le premier et le cinquantième jour ; dans le bac n°2, l'augmentation du nombre de germes est beaucoup moins élevée : multiplication par huit au cours des seize premiers jours puis nombre stationnaire jusqu'au cinquantième jour ; dans le bac n° 3 (témoin), le nombre de germes est multiplié par 10 pendant les 16 premiers jours et par quinze du premier au cinquantième jour.

- Dans l'eau :

Dans le bac n°1, le nombre de germes est multiplié par 12 entre le premier et le cinquantième jour. Dans le bac n°2, comme dans le cas de la vase, l'augmentation du nombre de germes est beaucoup plus faible : le facteur multiplicateur n'est que de 2 entre le premier et le cinquantième jour. Dans le bac n°3 (témoin), on observe le même phénomène que dans le

	Jours	0	16	50
/ VASE /	Bac 1	$0,17 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
	Bac 2	$0,17 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
	Bac 3	$0,17 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
/ EAU /	Bac 1	7×10^4	$3,5 \times 10^5$	8×10^5
	Bac 2	7×10^4	$1,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
	Bac 3	7×10^4	$1,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$

Tableau XXVII - Nombre de germes ammonifiants dans la vase (par g de vase humide) et dans l'eau (par ml d'eau) des 3 bacs au début au 16ème jour et à la fin de l'expérience (50ème jour).

bac n°2 : multiplication par 2 au cours de la même période.

L'augmentation du nombre de germes, comme la teneur en matière organique, est certainement reliée à la diffusion dans l'eau de la substance ajoutée à la vase.

Des relations entre les caractères chimiques et microbiologiques existent dans les deux milieux : dans la vase, l'adjonction de poudre de luzerne (bac n°1) a provoqué une prolifération importante de la microflore ammonifiante dès le 16ème jour (multiplication par 60) jusqu'au 50ème jour. Le dégagement d'azote ammoniacal observé dans l'eau est à peine commencé au 16ème jour alors que la microflore de la vase a été multipliée par 60. Entre le 16ème jour et le 50 ème jour, la teneur en azote ammoniacal de l'eau augmente en valeur relative beaucoup plus que la microflore ammonifiante de la vase.

Dans le bac n°2 (enrichi en feuilles de chêne), le dégagement d'azote ammoniacal dans l'eau ne devient important qu'après le 19ème jour, comme dans le cas du bac n°1, l'azote ammoniacal entre le 16ème et le 50ème jour augmente relativement plus que la microflore ammonifiante. Dans le bac n°3, la teneur en azote ammoniacal est pratiquement stationnaire bien que la microflore ammonifiante augmente.

2) Les courbes d'activité

Les courbes d'activité, au 16ème jour, de la microflore ammonifiante de l'eau et de la vase, sont présentées sur les figures n°28 et 29 ; sur chaque figure sont tracées les courbes correspondant à chacun des trois bacs.

Ces courbes recoupent les résultats trouvés pour l'azote ammoniacal dégagé dans l'eau et présent dans la vase ; dans l'eau, l'activité du bac n°1 est légèrement supérieure à celle des 2 autres bacs qui ont des courbes semblables ; dans la vase, l'activité du bac n°1 est nettement plus forte que celle des 2 autres ; le témoin a une activité plus forte que le bac n°2.

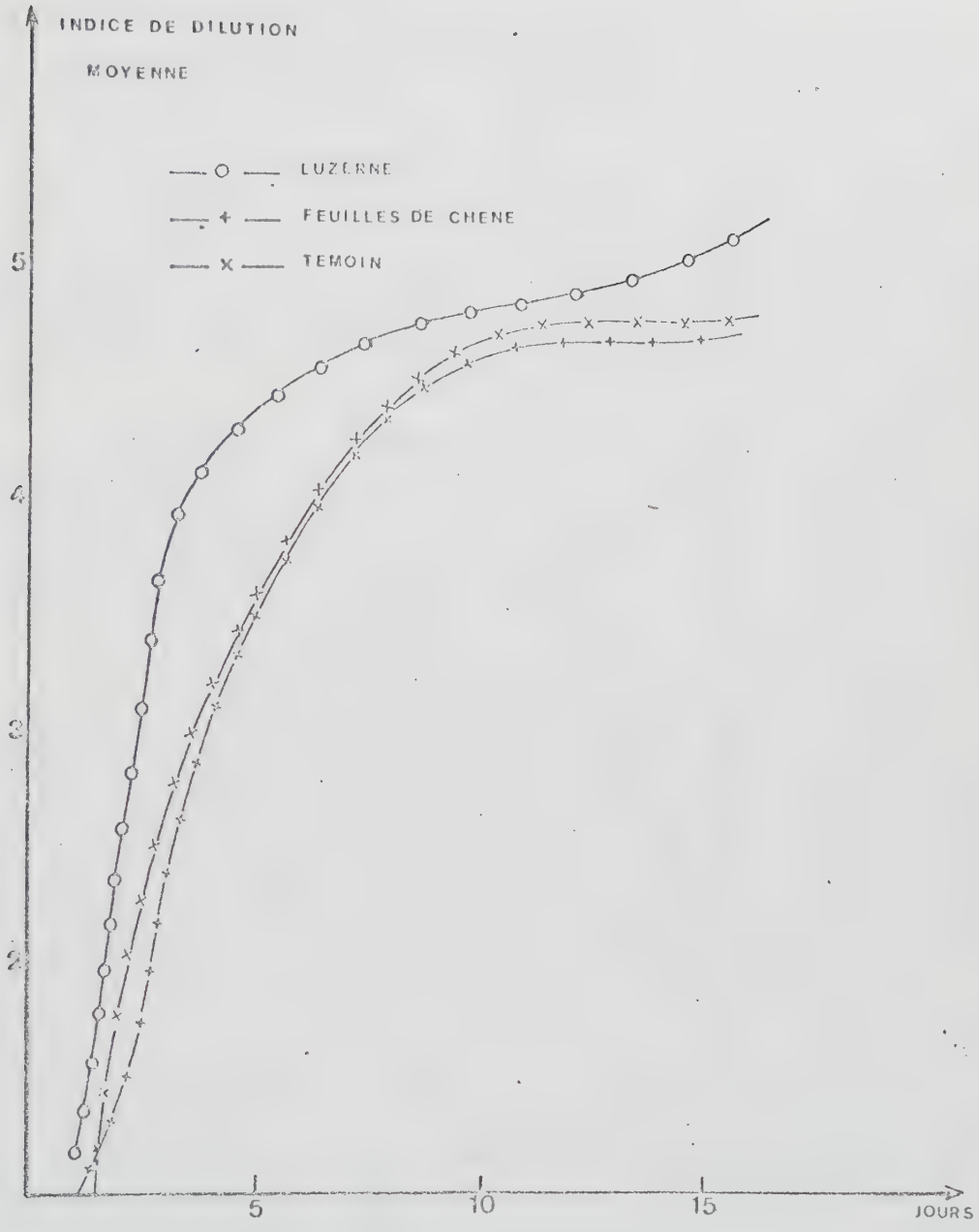


Fig. 28 - Courbes d'activité de la microflore ammonifiante dans l'eau des trois bacs (Logarithmes du nombre de germes en fonction du temps).

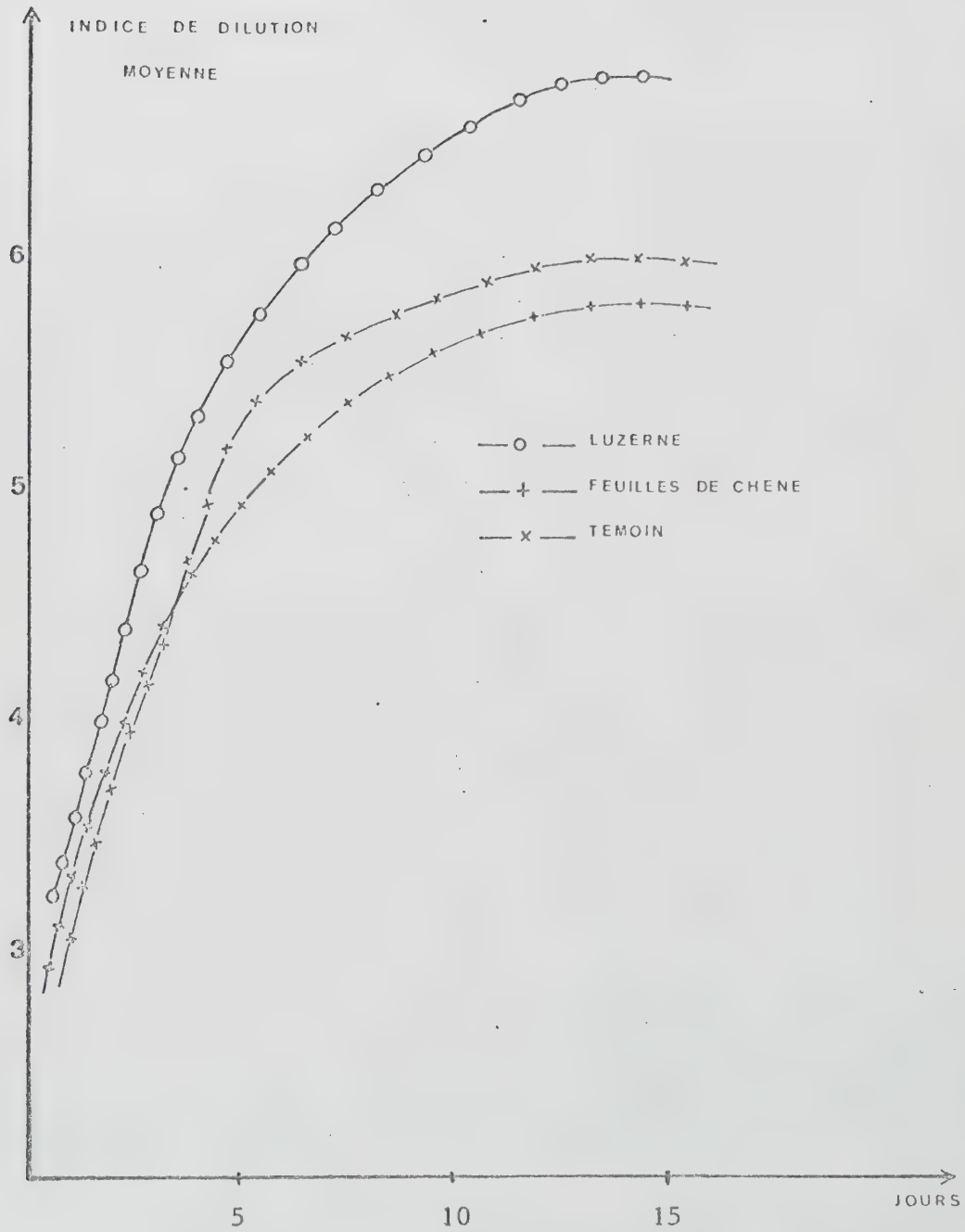


Fig. 29 - Courbes d'activité de la microflore ammonifiante dans la vase des trois bacs (Logarithme du nombre de germes en fonction du temps)

D - DISCUSSION DES RESULTATS

Les résultats de notre étude peuvent être mis en regard de ceux obtenus par JANSSON (1958) après enfouissement des pailles dans le sol : il a mis en évidence une minéralisation active de ce substrat ; SIMON (1960) a constaté, dans les mêmes conditions, une multiplication du nombre de germes ammonifiants. Notre travail est en accord avec ces résultats, cependant, l'augmentation du nombre de germes après enrichissement de la vase par la poudre de luzerne, est encore plus importante que celle mentionnée par SIMON.

Le rapport C/N trouvé ici (13) correspond à ceux déterminés auparavant dans les vases (KUZNETZOV, 1959 - WROBEL, 1965). Comme nous l'avons souligné, des relations existent dans la vase entre les caractères chimiques et microbiologiques :

On remarque que la teneur en azote ammoniacal est d'autant plus élevé que le nombre de germes ammonifiants est plus grand ; cependant, il n'y a pas de rapport linéaire entre l'augmentation du nombre de germes et celle de l'azote ammoniacal. On constate également que la teneur en azote ammoniacal de la vase du bac n° 2 est supérieure à celle du bac n° 3 (témoin). Or,la microflore ammonifiante dans le dernier bac a atteint un chiffre légèrement plus élevé que dans le bac n°2.

L'adjonction de feuilles de chênes broyées aurait donc un effet dépressif sur le nombre de germes ammonifiants. Des observations semblables ont été faites dans les sols par VAN SCHREVEN (1965) après adjonction de Polygonum nodosum broyé (C/N = 33 , égal à celui de la poudre de feuilles de chêne). L'auteur a, en outre, remarqué une action différente entre la matière fraîche et la matière sèche broyée : l'addition de matière fraîche entraîne un dégagement d'azote ammoniacal supérieu à celui du témoin alors qu'on observe l'effet inverse quand on ajoute la matière sèche broyée. Dans notre travail, il est possible que le sèchage des feuilles de chêne n'ait pas été complet ce qui expliquerait l'importance relative du dégagement d'azote ammoniacal observé.

Dans l'eau des 3 bacs n°1, n°2 et n°3, la microflore augmente beaucoup moins que dans les vases correspondantes : il semble donc que l'action des substrats organiques ajoutés à la vase retentit sur la microflore de l'eau dans une mesure beaucoup plus faible que sur celle de la vase.

Les bilans d'azote montrent qu'en valeur absolue, la plus grande quantité d'azote disparu et retrouvé, intéresse le bac contenant la luzerne, et ceci confirme que, dans ce bac, la minéralisation a été la plus active.

L'imprécision de ces bilans pourrait provenir de plusieurs causes :

- L'immobilisation, c'est-à-dire l'adsorption de l'azote ammoniacal au niveau des colloïdes du sol (DOMMERGUES,1967) ;

- La réorganisation qui peut d'ailleurs être rapidement suivie de minéralisation ; en effet, selon certains auteurs,le turnover de de l'azote est très rapide dans les eaux ; GOLTERMAN (1967), lors d'une expérience effectuée dans des bacs en matière plastique contenant seulement de l'eau, a montré que tous les Chlamydomonas morts sont minéralisés en trois jours ; OHLE (1962), travaillant "in situ" dans la partie supérieure d'un sédiment lacustre, a observé une minéralisation de 90 % de l'azote organique au bout de deux semaines.

Dans notre étude, l'augmentation de la teneur en azote organique de l'eau peut être due à la réorganisation ou à la diffusion vers l'eau des substances ajoutées à la vase.

- La nitrification par les microorganismes, qui peut elle-même être suivie de réorganisation ou de dénitrification. VAN SCHREVEN (1965) a mis en évidence une faible immobilisation et une minéralisation importante en ajoutant au sol une substance à rapport C/N bas, et

l'inverse avec une substance à rapport C/N élevé. Ici, nous avons constaté un phénomène analogue, avec une forte minéralisation dans le bac contenant la luzerne et une faible minéralisation avec les feuilles de chêne.

E - CONCLUSION

Dans les milieux aquatiques, en présence de pourcentages faibles de saturation en oxygène dans l'eau, l'ammonification de l'azote organique de la vase a lieu. Alors que dans les milieux aérobies, c'est-à-dire les sols, l'ammonification est souvent suivie d'une nitrification intense, on observe dans les vases une nitrification faible et une réorganisation relativement importante (jusqu'à 20 % de l'azote ammoniacal dégagé dans l'eau).

L'ammonification la plus active, au point de vue du nombre de germes et de la production d'azote ammoniacal, et du taux d'ammonification, s'effectue dans la vase additionnée de poudre de luzerne, substance à rapport C/N bas. L'apport de poudre de feuilles de chêne entraîne un dégagement d'azote ammoniacal plus important que celui existant dans le témoin où la microflore ammonifiante est plus active. Il est possible que les tannins apportés par les feuilles de chêne jouent un rôle inhibiteur sur la microflore.

Le rendement de l'apport de matière organique azotée peut être défini comme le rapport suivant :

$$\frac{\text{Az. Minéral produit dans l'eau + Az. Minéral produit dans la vase + Az. réorganisé dans l'eau}}{\text{Azote organique disparu de la vase}}$$

Ce rendement est faible dans les bacs enrichis (7 pour cent) et atteint 46 p. cent dans le témoin.

L'ammonification est stimulée, mais la production d'azote ammoniacal atteint assez rapidement un palier. Une partie de l'azote ammoniacal est récupérée par les microorganismes nitrifiants ; il nous a semblé nécessaire d'étudier expérimentalement la nitrification dans les vases.

CHAPITRE III

NITRIFICATION AUTOTROPHE ET HETEROTROPHE DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES

xxxxxxxxxxxx

Les microorganismes responsables de la nitrification dans les sols sont classiquement considérés à la fois comme aérobies stricts et comme autotrophes. Il semble que dans les milieux aquatiques la nitrificati ait lieu de façon différente ; nous avons souligné à maintes reprises l'importance de la nitrification pour expliquer les phénomènes que nous avons constaté. Il nous a semblé nécessaire d'effectuer une étude expérimentale de ce problème, après avoir repris des données écologiques concernant 8 lacs et étangs.

Deux catégories de recherches sont poursuivies :

D'une part, le rôle de l'aérobiose et de l'anaérobiose dans la nitrification, ainsi que l'importance de la nitrification hétérotrophe sont étudiés en utilisant des modèles simplifiés d'écosystèmes aquatiques, le modèle anaérobie étant constitué d'une ampoule (fig.4) et le modèle aérobie d'une simple fiole d'Erlenmeyer.

D'autre part, un certain nombre de points concernant la nitrification hétérotrophe par les Arthrobacter ont pu être précisés : propriété nitrifiantes, capacité de ces germes à restituer son pouvoir de nitrificati à la vase après stérilisation, seuil thermique de la nitrification.

A - OBSERVATIONS "IN SITU"

Le tableau XXVIII présente les résultats des mesures effectuées dans 8 lacs et étangs ; on note sur ce tableau que les rH des milieux

ORIGINE DE LA VASE	CARACTERISTIQUES MICROBIOLOGIQUES, PHYSIQUES ET CHIMIQUES				
	pH	rH	M.O. (% de M.S)	Nombre de germes par gramme de vase humide	
				Nitreux	Nitriques
Lac d'Annecy	7	13	2,21	19	0
Lac du Mont-Cenis	7,5	12	4,5	50	0
Lac d'Eguzon	5,5	11,2	14,8	500	190
Lac de Nantua	6,4	9,6	6,4	190	50
Etang de la Pâture	6,6	12	2,7	500	50
Etang de la Rouillie	7,1	11	18	90	19
Etang Palis	6,2	12	5,7	500	19
Rivière Laronde	7,5	13	8,2	190	50

Tableau XXVIII - Nombre de germes nitrifiants. pH, rH et matière organique dans diverses vases.

étudiés se situent relativement bas dans l'échelle de PREVOT (1960), ils sont caractéristiques des milieux partiellement anaérobies. Ce fait nous a conduit à étudier la nitrification dans des conditions de rH voisines de celle de la nature et, pour cela, à réaliser une ampoule où le rH puisse être maintenu à un niveau suffisamment bas. La valeur la plus fréquente (rH = 12 soit E = - 85 mV.) a été prise comme rH de référence dans les expériences menées dans l'ampoule. On note également ici, la faiblesse des nombres, même maximaux, des germes nitriques et nitreux par rapport aux nombres trouvés dans les sols (POCHON et DE BARJAC - 1958).

On a repris dans le tableau XIX les données concernant le nombre de germes nitreux et nitriques ainsi que les teneurs en azote ammoniacal et nitrique dans la vase et l'eau de l'étang de la Rouillie, au cours d'un cycle annuel ; les résultats sont présentés sous forme de graphe sur la figure 30. On remarque que le nombre de germes nitriques est toujours inférieur à celui des germes nitreux; Or, on n'a jamais pu déceler les nitrites très instables et très rapidement oxydés en nitrates ou réduits en sels ammoniacaux. Un maximum pour les germes nitreux et nitriques se situe en Septembre. Ce fait est en accord avec les résultats de KUZNETZOV (1959). Le maximum du nombre de germes au mois d'Avril concorde avec une valeur élevée des taux de sels nitriques et ammoniacaux. Cependant, l'examen du graphique montre qu'il n'existe pas de concordance absolue et permanente entre la poussée des germes nitriques et la teneur en azote nitrique. Nous retrouvons ici ces décalages observés précédemment dans l'étude écologique à propos de l'azote ammoniacal : la teneur en azote minéral dans la vase dépend non seulement des bactéries produisant l'azote ammoniacal (ammonifiantes) ou nitrique (nitrifiantes), mais aussi de la microflore algale qui utilise cet azote minéral ; lors des périodes de l'année où la microflore algale est absente, les formes de l'azote ont tendance à s'accumuler alors qu'elles sont rapidement réorganisées aux périodes de végétation.

Cette étude écologique nous montre qu'avec des nombres de germes faibles, la nitrification a lieu. Or, les germes dénombrés ici, sont les

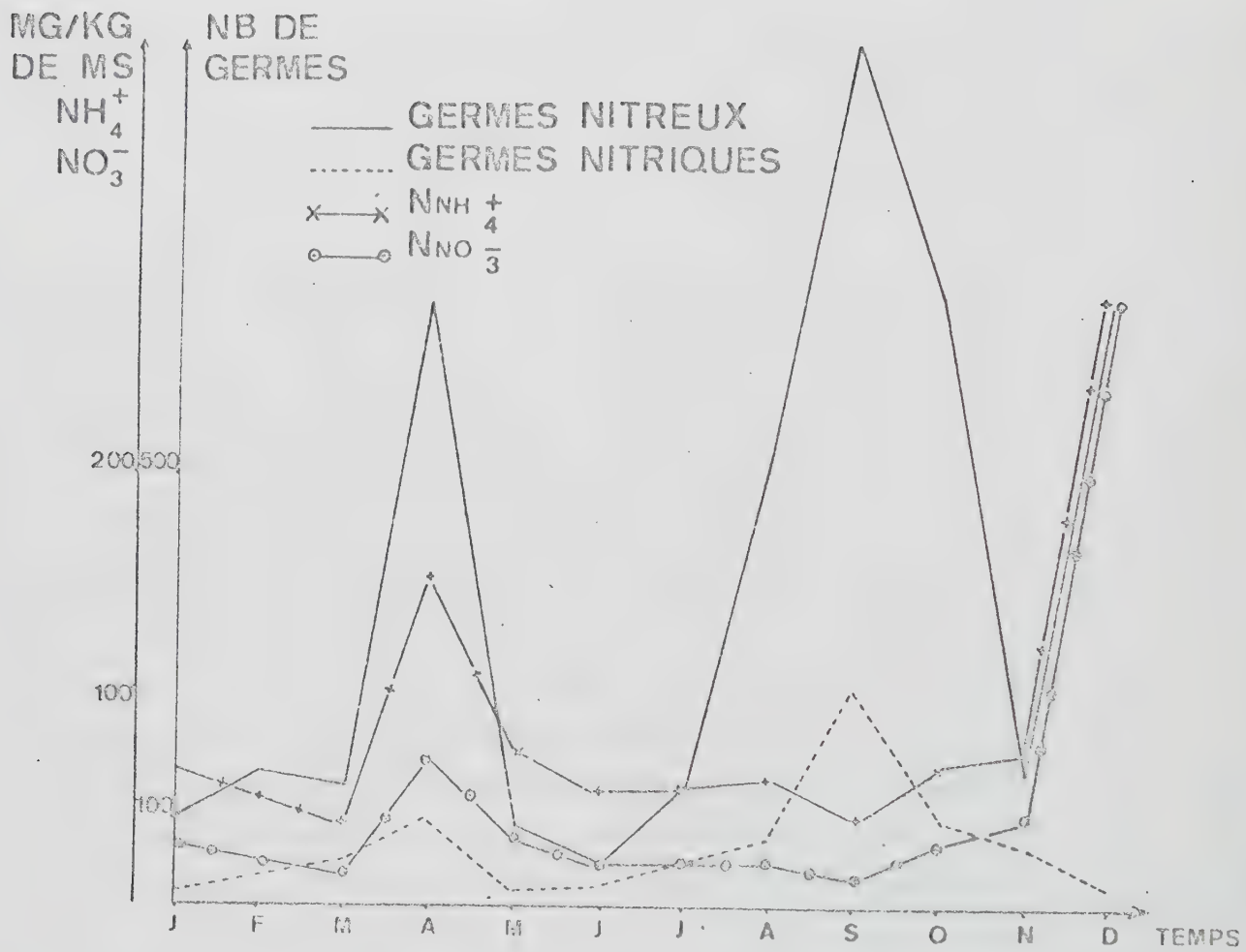


Fig. 30 - Variations annuelles des teneurs en nitrates et nitrites, d'une part du nombre de germes nitreux et nitriques, d'autre part dans la vase de l'étang de la Rouillie au cours d'une année : en abscisse les mois, en ordonnées NO_3^- et NH_4^+ en p.p.m de matière sèche, et sur le deuxième axe, le nombre de germes par gramme de vase.

MOIS	NOMBRE DE GERMES PAR GRAMME DE VASE HUMIDE		AZOTE MINERAL EXPRIME EN MG PAR KG DE VASE SECHE	
	Nitreux	Nitriques	NO_3^-	NH_4^+
Janvier	100	15	28	63
Février	150	30	22	50
Mars	140	50	14	40
Avril	700	100	70	150
Mai	90	19	30	66,8
Juin	50	50	20	54
Juillet	130	50	18	55
Août	500	80	20	60
Septembre	1000	250	15	40
Octobre	700	100	30	65
Novembre	150	80	40	70
Décembre	700	25	270	280

Tableau XIX - Nombre de germes nitrifiants par gramme de vase humide de l'étang de la Rouillie au cours d'un cycle annuel. Teneur en $N(NH_4^+)$ et $N(NO_3^-)$ en ppm dans la vase.

nitrificateurs classiques ; nous sommes donc conduits à admettre que, en plus des nitrificateurs classiques, d'autres germes seraient nitrifiants et ne seraient qu'imparfaitement dénombrés par la technique classique.

B - ETUDES SUR MODELE

Dans le but de mettre en évidence la nitrification dans des conditions anaérobies (potentiel redox bas) et de la comparer avec la nitrification en conditions aérobies, on a utilisé les deux modèles décrits dans la partie "Matériel et Méthodes", l'ampoule ou règne l'anaérobiose et la fiole d'Erlenmeyer qui simule un milieu aérobie.

Ensuite, on a cherché, en restant en milieu anaérobie, à se rendre compte de l'influence de la matière organique sur la nitrification en utilisant la méthode des passages.

1) Comparaison Aérobiose - Anaérobiose

Chacun des deux modèles est constitué de 500 ml du milieu suivant :

- $(NH_4)_2\ SO_4$	0,5	g
- Bactopeptone	0,5	g
- Extrait de levure	0,5	g
- $CO_3\ Ca$	1	g
- Solution de Winogradsky	10	ml
- Eau distillée q.s.p	1000	g

Dans le modèle n°1, le potentiel redox est maintenu entre - 220 mV et + 50 mV ($8 \leqslant rH \leqslant 16$); la valeur moyenne choisie, rH = 12, est la valeur observée le plus fréquemment dans les milieux naturels (voir tableau XXVIII).

Les résultats globaux de l'expérience sont inscrits sur le tableau XXX traduit par la figure 31 qui montre l'importance de la production de nitrites en aérobiose (ceci est une donnée classique) : notons cependant que, dans les conditions de la culture, les nitrites peuvent s'accumuler, alors qu'au contraire, dans la nature, leur existence est fugace. La production de nitrite est beaucoup plus faible en anaérobiose qu'en aérobiose. Toutefois, dans le cas de l'anaérobiose, la nitrification se produit jusqu'au stade nitrate. Dans ces deux conditions, l'apparition de nitrites et de nitrates est accompagnée d'une diminution équivalente d'azote ammoniacal : la nitrification s'exerce donc en partie aux dépens de ce dernier. La faible importance des nitrates peut provenir d'une dénitrification due à la microflore dénitrifiante de l'inoculum.

2) Influence de la matière organique sur la nitrification. Méthode des passages.

Pour apprécier un éventuel blocage de la nitrification lors de la disparition de la matière organique, on a utilisé la méthode des passages : le modèle n°1 est empli de 500 ml de milieu précédent, inoculé par 3g de vase et mis en incubation dans les mêmes conditions de rH que précédemment. Au bout de 21 jours, une fraction de l'ensemble (10 ml) est transvasé dans un nouveau modèle n°1 contenant 500 ml du milieu précédent sans extrait de levure ni peptone. Après 21 jours, on répète l'opération ; on a réalisé ainsi deux passages avec, à chaque fois, une diminution importante de la quantité de matière organique qui devient pratiquement nulle après le deuxième passage. A la fin de chaque incubation, on dose l'azote ammoniacal, nitreux et nitrique.

Le tableau XXXI récapitule les résultats de l'expérience ; la teneur en matière organique diminue après chaque passage : on constate une diminution corrélative de la production de nitrites, celle de nitrates restant toujours faible. L'abaissement de la teneur en nitrites proviendrai soit de la baisse d'activité des nitrificateurs hétérotrophes due à une grande diminution de la teneur en matière organique, soit de la réduction du nombre des germes nitreux et nitriques visibles sur le tableau XXXI.

Formes de l'azote minéral (en % d'azote minéral total)	Initialement	Anaérobiose (après 21 jours)	Aérobiose (après 21 jours)
NH_4^+	100 %	95 %	28 %
NO_2^-	0	4 %	72 %
NO_3^-	0	1 %	0

Tableau XXX - Pourcentages des 3 formes d'azote minéral (NH_4^+, NO_2^-, NO_3^-)

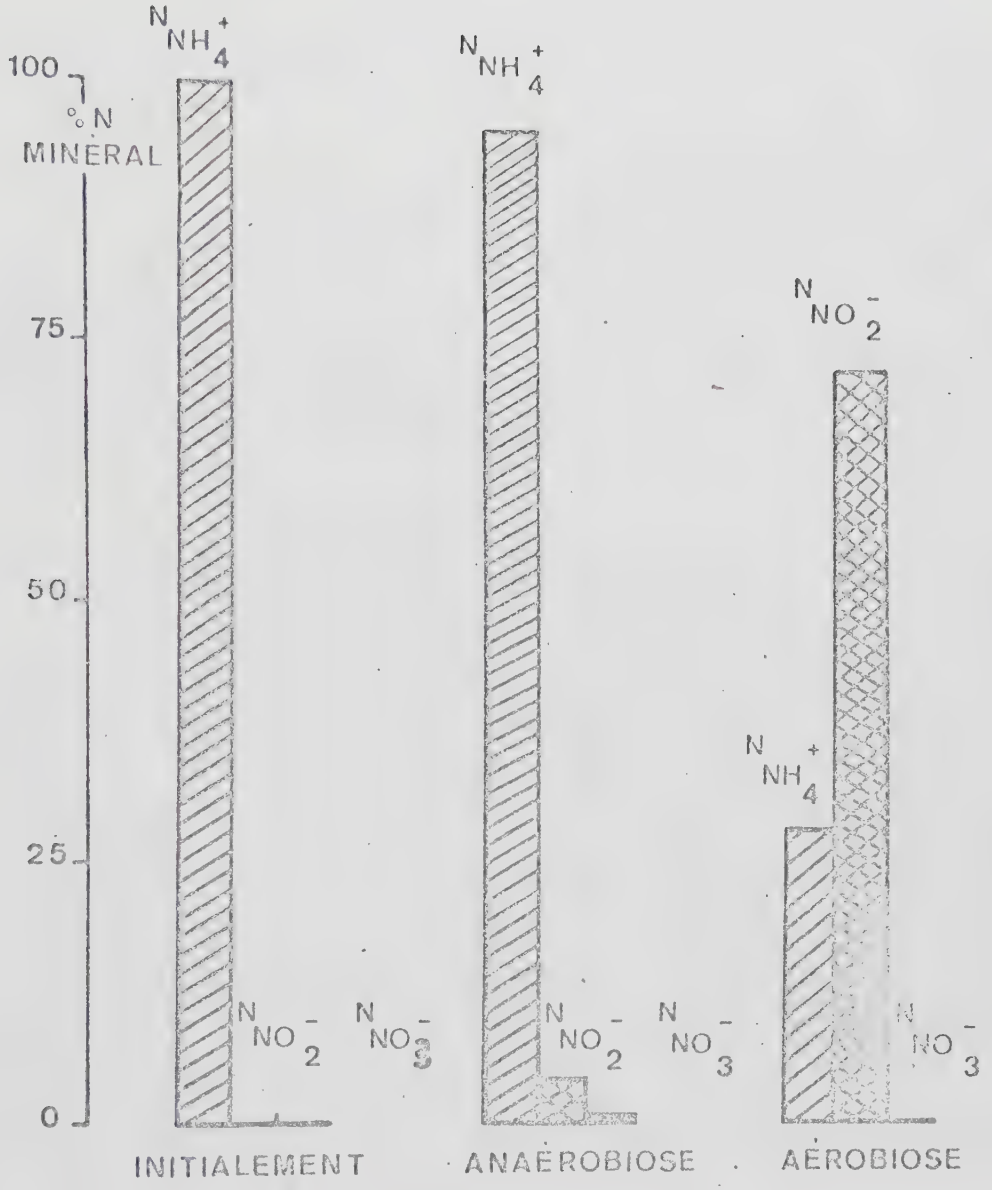


Fig. 31 - Pourcentage des 3 formes d'azote minéral (NH_4^+, NO_3^-, NO_2^-) initialement et après incubation en anaérobiose et aérobiose (première expérience).

FORMES DE L'AZOTE	PASSAGES		
	1er passage	2ème passage	
	1er récipient → 10 ml	2e récipient → 10 ml	3e récipient
NH_4^+ ppm	101	103	104,4
NO_2^- ppm	4,3	2,1	1,6
NO_3^- ppm	0,2	0,1	0,1
mg de matière organique dans le milieu	680	13,6	moins de 0,1
Nombre de germes nitreux	3.500	1.300	450
Nombre de germes nitriques	11	2	0

Tableau XXXI - Nitrification au cours de deux passages en anaérobiose (rH = 12). Les mesures sont faites dans le surnageant après 21 jours d'incubation dans l'ampoule.

Malgré la présence de NH_4^+, on constate une baisse de la nitrification en même temps que diminue la teneur en matière organique : l'existence de la nitrification hétérotrophe,en plus de la nitrification autotrophe, semble donc ainsi indubitable.

C - NITRIFICATION PAR LES ARTHROBACTER

Après la mise en évidence de la nitrification hétérotrophe dans la vase, nous nous sommes tourné vers les germes susceptibles d'effectuer cette fonction. GUNNER (1963) a étudié une souche d'Arthrobacter globiformis et a montré que ces bactéries nitrifient l'azot en nitrites et nitrates. Aussi, nous avons isolé des souches d'Arthrobacte de la vase et étudié leurs propriétés.

1) Propriétés nitrifiantes

Cinq souches d'Arthrobacter sont isolées de la vase. Le tableau XXXII présente les quantités d'azote ammoniacal, nitreux et nitrique, ainsi que d'hydroxylamine après incubation de chacune des souches dans le modèle n°2 (21 jours d'incubation à 18°), contenant le même milieu que précédemment. On observe sur ce tableau l'absence générale d'hydroxylamine si la nitrification par les Arthrobacter passe par le stade hydroxylamine, il est certainement de courte durée. On voit d'autre part que toutes les souches d'Arthrobacter mises en culture ne sont pas identiques quant à la production de nitrites et nitrates ; nous avons vérifié, en anaérobiose, les propriétés nitrifiantes des souches 4 et 5 que nous avons utilisées dans la suite.

2) Ensemencement de vase stérilisée

Pour montrer avec certitude le rôle des Arthrobacter, il nous a semblé nécessaire de nous rendre compte si ces germes pouvaient restituer ces propriétés nitrifiantes à une vase qui en a été privée par stérilisation.

FORMES DE L'AZOTE	N° DES SOUCHES				
	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
NH_4^+ ppm	105,9	105,5	104	100	101
NO_2^- ppm	traces	traces	0,003	0,008	0,067
NO_3^- ppm	traces	0,05	1,6	5,4	4,9
NH_2OH ppm	néant	néant	néant	néant	néant

Tableau XXXII - Etude comparée des propriétés nitrifiantes de 5 souches d'Arthrobacter en culture pure, après 21 jours d'incubation à 20°C.

Le modèle n°2 (fiole d'Erlenmeyer) est utilisé : 500 ml du milieu précédent, 200 g de vase humide stérilisée à la chaleur, sont inoculés par 10 ml de culture liquide d'Arthrobacter de la souche S_4 contenant 10^6 cellules au ml ; on répète l'opération pour la souche S_5.

On prépare également un témoin sans inoculum et on incube l'ensemble pendant 21 jours à 28°C. Au bout de ce temps, on dose NH_4^+, NO_2^- et NO_3^- et on dénombre les Arthrobacter dans le surnageant et dans la vase.

Le tableau XXXIII présente les résultats de cette expérience. Les nitrates et les nitrites sont produits en quantité appréciable dans les deux cas tandis que la production est pratiquement nulle dans le témoin où les 4 p.p.m. de nitrate trouvées proviennent de la vase initiale. La nitrification après ensemencement va jusqu'au stade nitrate, comme dans le cas d'une culture pure. En ce qui concernent les numérations, le nombre de germes initial était de 10^7 pour les deux souches (10 ml de culture à 10^6 germes par ml) : le nombre de germes final est égal à la somme des germes du surnageant et de la vase, soit en gros :

- pour le surnageant : 500 ml x 2 x 10^5 = 10^8
- pour la vase : 200 g x 4 x 10^9 = 10^{11}

Le premier total comparé au second est négligeable (moins de 1 p.1000).

Le nombre de germes est passé de 10^7 (nombre de germes initial) à 8 x 10^{11}, il y a bien eu multiplication des Arthrobacter. Les Arthrobacte ont colonisé l'ensemble du milieu et de la vase mis en expérience. Le nombre de germes par gramme de vase humide est beaucoup plus grand que le nombre de germes par ml de surnageant : ceci est en accord avec toutes les numérations de germes effectuées dans les vases.

FORMES DE L'AZOTE	Témoin		Réensemencement S4		Réensemencement S5	
	Surnageant	Vase	Surnageant	Vase	Surnageant	Vase
NH_4^+ ppm	105,7	357	98,9	348	97,6	350
NO_2^- ppm	traces	néant	0,6	1,6	1,1	0,8
NO_3^- ppm	néant	4	5,4	14,1	5,8	13,2
Nombre d'Arthrobacter par ml de surnageant ou par g de vase humide	—	—	$2,1 \times 10^5$	4×10^9	$3,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^9$

Tableau XXXIII - Nitrification après stérilisation de la vase et réensemencement avec Arthrobacter après 3 semaines d'incubation à 28°C appréciée dans le surnageant et la vase.

3) Influence de la température

Dans les vases situées sous des profondeurs d'eau assez grandes, la température reste relativement basse au cours de l'année. Aussi, nous a-t-il paru nécessaire de déterminer les seuils thermiques de la nitrification pour les deux souches 4 et 5 d'Arthrobacter déjà étudiées précédemment. On utilise une culture en aérobiose avec le même milieu que dans l'expérience précédente. Les fioles d'Erlenmeyer sont introduites dans un thermostat : l'incubation dure 15 jours et s'effectue aux températures suivantes : 0°, 4°, 8°, 10°,12°, 14°, 16°, 20°, 24°, 28°C ; chaque fiole renferme 500 ml de milieu et est inoculée avec 10 ml de culture de chaque souche d'Arthrobacter contenant environ 10^6 cellules dénombrées sur le milieu gélosé en plaque, par la méthode classique des dilutions.

Les figures 32 et 33 donnent les résultats de l'étude de la nitrification par les Arthrobacter en fonction de la température. Les courbes représentent respectivement les variations de la production d'N sous forme NO_3^- et NO_2^- suivant les températures d'incubation.

La souche S_4 est active à partir de 12°C pour les nitrates et de 14°C pour les nitrites et présente un palier à partir de 20°C. La souche S_5 voit la production de nitrates et de nitrites débuter à partir de 10°C et montre un maximum à 22°C pour les nitrates et à 24°C pour les nitrites. Les quantités produites sont du même ordre de grandeur pour les deux souches.

D - DISCUSSION DES RESULTATS

Comme nous l'avons montré ici, la nitrification a lieu dans des milieux pauvres en matière organique. En eau de mer, VACELET note que les nitrites et nitrates sont présents toute l'année : or, les numérations de germes nitrifiants donnent toujours des nombres très faibles qui n'expliquent pas l'importance des quantités de nitrites et nitrates. Toutefois, les observations faites en mer et également dans l'étang de la Rouillie (fig.31) indiquant des variations saisonnières dans les nombres

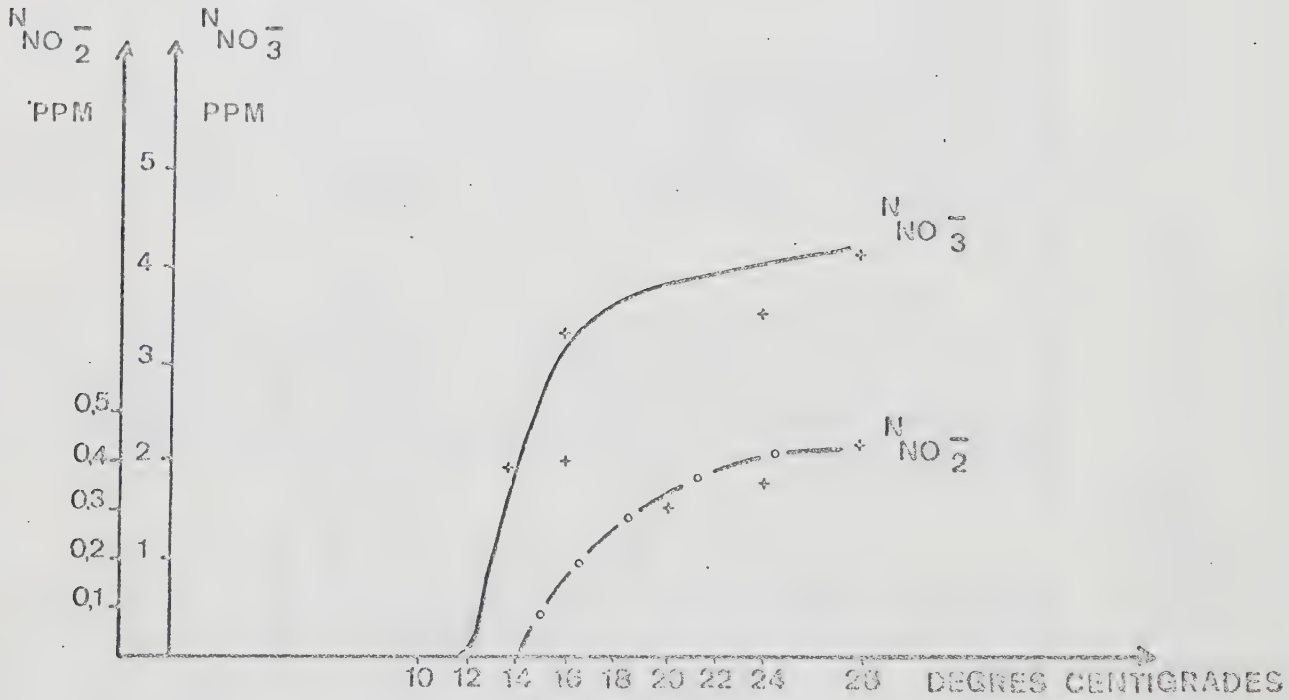


Fig. 32 - Importance de la nitrification à diverses températures par la souche S_4 après incubation pendant 21 jours.

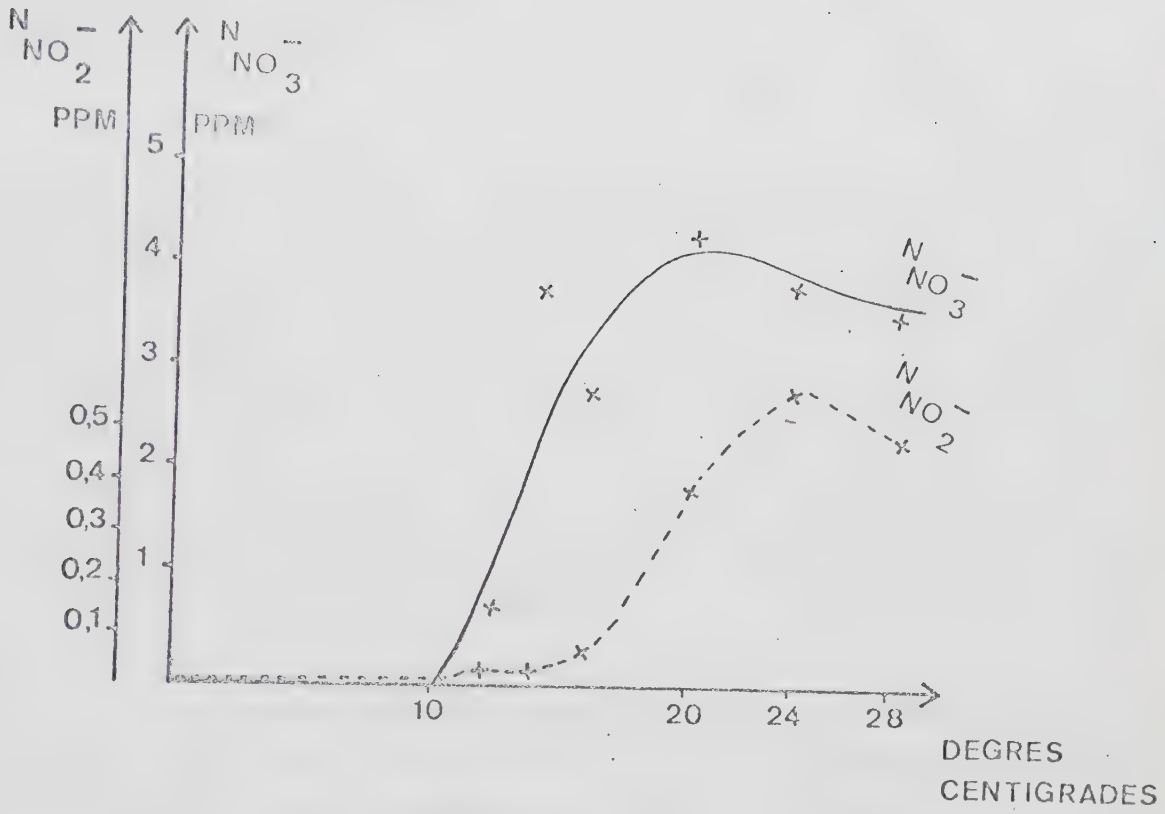


Fig. 33 - Importance de la nitrification à diverses températures par la souche S_5 après incubation pendant 21 jours.

de germes ; des variations correspondantes existent dans les quantités de nitrates et de nitrites mais plus ou moins décalées par rapport aux précédentes. Ce décalage montre qu'une partie des germes nitrifiants n'est pas dénombrée par les méthodes classiques, et VACELET avance l'hypothèse de la présence simultanée des autotrophes et des hétérotrophes. KAISER et LAURENT (1964) ont mis en évidence la présence de nitrificateurs en faible nombre dans des biotopes variés.

En ce qui concerne le rapport du nombre de germes nitreux ou nitriques dans les vases marines du port d'Alger, TYSSET, BRISOU et MOREAU (1963) mentionnent la présence de nitrificateurs, avec 100 fois plus de nitrosants que de nitratants. D'autre part, GENOVESE, MACRI et RIGANO (1964) dénombrent une plus grande quantité de germes nitreux que de germes nitriques (rapport de 1 à 1000), dans un étang saumâtre ; RHEINHEIMER(1964) relève dans l'Elbe un nombre de nitrosants toujours supérieur à celui des nitratants. Les observations des auteurs précédents s'accordent avec les recherches effectuées dans l'étang de la Rouillie.

La prolifération des germes observée dans la partie superficielle de la vase au printemps s'explique donc bien : d'une part, le réchauffement influe sur la microflore hétérotrophe : nous l'avons vu avec les Arthrobacter, et RHEINHEIMER (1965) l'a observé dans l'Elbe ; d'autre part, la poussée des algues au printemps entraîne un apport d'oxygène par photosynthèse que favorise l'activité de la microflore nitrifiante autotrophe.

Les résultats des expériences réalisées en anaérobiose prouvent que la matière organique est nécessaire pour que la nitrification puisse avoir lieu dans des conditions de potentiel redox bas, mais ceci n'exclut pas la présence de nitrificateurs classiques dont certaines espèces sont, sans doute, spécifiques des eaux et restent encore mal connues. WATSON (1965) a isolé une espèce nouvelle, Nitrosocystis oceanus, de l'Océan Pacifique : le nombre de ces germes est faible, (environ 1 par litre). La quantité d'ammoniaque transformée en nitrates a été évaluée à 0,07 mg N (sous forme NO_2^-) 1/an.

De plus, les nitrificateurs autotrophes supportent des concentrations d'oxygène relativement basses. Pour SCHOBERL et ENGEL (1964), Nitrosomonas europaea se développe dans l'eau tant que la concentration d'oxygène dissous est supérieure à 1 mg/l. Dans le cas de Nitrobacter Winogradskyi à 20°C, la nitrification est très ralentie mais se produit encore à une concentration de 0,6 mg/l (BOON et LANDELOUT - 1962).

RHEINHEIMER (1965) a démontré que des nitrosants peuvent vivre à la surface de la vase, et rejoint ainsi l'hypothèse de KUZNETZOV (1959). Selon MALAVOLTA, CROCOMO et DELWICHE (1965), Nitrobacter et Nitrosomonas seraient susceptibles d'incorporer le CO_2 par voie hétérotrophe. En outre, TANDON et RASTOGI (1965) ont remarqué que, jusqu'à une concentration de 10 mg/l, le glucose et le fructose favorisent l'activité de Nitrosomonas qui utilise alors une certaine quantité de matière organique.

Il semblerait donc, d'après nos résultats et ceux de la littérature, que les nitrificateurs classiques pourraient utiliser la matière organique et supporter des conditions de vie relativement anaérobies.

Les souches d'Arthrobacter, isolées de la vase de l'étang de la Rouillie, ont manifesté une activité plus grande dans les erlenmeyers présentant une grande surface par rapport au volume que dans les ampoules à rH contrôlé ; donc, leur activité est favorisée par la présence d'oxygène bien qu'elles soient susceptibles de nitrifier en condition d'anaérobiose partielle. GOUNOT (1967) a dénombré les Arthrobacter dans un limon de grottes ($2,6 \times 10^{-6}$ cellules/g de sol sec) et admet que ceux-ci peuvent se développer en milieu inondé. La température minimale pour la croissance est de 10°C.

E - CONCLUSION

Ce travail permet de dégager un certain nombre de points éclairant les processus de nitrification dans les eaux et les vases.

Les travaux faits sur le terrain, au cours du cycle annuel, prouvent que le nombre de germes nitreux est toujours inférieur au nombre des germes nitriques : les mesures de potentiel redox des sédiments

de diverses origines conduisent à la valeur la plus fréquente de 12, identique à celle existant sous quelques millimètres de gélose profonde (classification de PREVOT - 1960). Cette valeur indique des conditions d'anaérobiose partielle. On peut noter également l'importance des nitrates en fin d'automne ou début d'hiver, au moment de la disparition de la microflore algale : l'azote ammoniacal est toujours beaucoup plus abondant que l'azote nitrique. En effet, les processus d'ammonification ont lieu en permanence dans les vases.

L'observation, au laboratoire, des modalités de la nitrification montre que celle-ci se produit à la fois sous l'influence de microorganismes autotrophes et hétérotrophes et dans des conditions relativement anaérobies (rH compris entre 8 et 16) . Les microorganismes autotrophes, réputés aérobies, pourraient supporter de faibles teneurs en oxygène et utiliser certaines substances organiques.

L'étude de l'influence de la matière organique sur la nitrification, par la méthode des passages, met en évidence la diminution de l'activité de la microflore nitrifiante corrélativement à celle de la quantité de matière organique présente dans le milieu. Dans tous les cas, la nitrification autotrophe et hétérotrophe est favorisée par l'élévation de la teneur en oxygène.

Deux souches du genre Arthrobacter ont été sélectionnées parmi les 5 souches isolées de la vase. Elles sont capables de produire des nitrates à partir de l'ammoniaque et de la matière organique. Le grand nombre de ces germes dans les vases fait ressortir l'importance de leur rôle de nitrification dans la nature. Chez ces bactéries, on a vérifié l'influence positive de la teneur en oxygène sur la nitrification ; l'hydroxylamine n'a pas été décelée comme intermédiaire dans la culture pure alors que des traces ont été trouvées dans les expériences de réensemencement.

Les Arthrobacter possèdent donc bien des propriétés nitrifiantes dans les conditions écologiques régnant dans les vases.

Les dénombrements de ces germes, effectués après réensemencement de la vase stérile, montrent une multiplication importante et une recolonisation effective du milieu. La production d'azote nitrique par cellule est faible. La nitrification hétérotrophe n'a pratiquement pas lieu à une température inférieure à 12°C.

Il est donc vraisemblable que, dans la plupart des milieux aquatiques (rivières, étangs, lacs), la nitrification de l'ammoniaque s'effectue dans les vases, sous l'action de bactéries autotrophes et hétérotrophes, en présence de faibles quantités d'oxygène et uniquement sous l'action des hétérotrophes, quand les teneurs en oxygène sont plus basses. Dans le cas de vases très réductrices on peut penser que la nitrification ne se produit pas.

CHAPITRE IV

ETUDE DES GAZ DEGAGES PAR LA VASE

xxxxxxxxxxx

Nous avons constaté maintes fois, et en particulier dans le chapitre II, que les bilans d'azote sont, sinon impossibles à établir rigoureusement, du moins très imprécis. Les déficits d'azote sont importants et il est nécessaire de tenter de les expliquer :

- les pertes par dégagement de NH_3 gazeux sont pratiquement impossibles dans les conditions naturelles ;

- les pertes par nitrification de NH_4^+, suivies de dénitrification en azote gazeux, existent certainement ; cependant, nous avons vu dans le chapitre III que la nitrification, si elle a lieu par voie autotrophe et hétérotrophe, est limitée dans son importance ;

- dans ces conditions, nous avons tenté de vérifier l'hypothèse émise par KUZNETZOV (1959) qui suppose l'existence d'un passage direct de l'azote organique à l'azote gazeux dans les vases, c'est-à-dire en anaérobiose. Cette formation d'azote gazeux entraînerait évidemment une perte d'azote et pourrait être une des causes de l'imprécision des bilans.

Dans le but de résoudre ce problème, nous avons analysé les mélanges gazeux issus de la vase, à la fois "in situ" et au laboratoire, en ajoutant à la vase des substrats variés.

A - MELANGE GAZEUX PRELEVE "IN SITU"

Les résultats de l'analyse sont inscrits sur le tableau XXXIV ci-dessous :

VOLUME PRELEVE : 5 ml	
Gaz détectés	Pourcentage
CO_2	0,8 %
Ar	0,5 %
O_2	4 %
N_2	31,9 %
CH_4	62,8 %
N_2/Ar	64 %

Tableau XXXIV - Résultats d'analyse exprimés en pourcentages du mélange gazeux prélevé directement dans l'étang de la Rouillie .

On remarque un pourcentage faible pour le gaz carbonique (CO_2) et fort pour le méthane (CH_4). En effet, le gaz carbonique formé au cours de la minéralisation du carbone organique, peut évoluer de diverses manières:

1 - Une partie passe dans l'eau par échange,au niveau de l'interface vase-eau et sert alors pour la photosynthèse ;

2 - Une partie est transformée en méthane (CH_4), en un temps variable, à la faveur des conditions anaérobies régnant dans la vase. Le CO_2 représente donc la fraction non encore transformée en CH_4. On observe également

un pourcentage d'azote relativement important (31,9 %). Cet azote peut provenir de l'air dissous dans l'eau interstitielle de la vase, air qui est appauvri en oxygène sous l'action du métabolisme des organismes vivants

L'examen du rapport azote/argon nous apporte des précisions : il a une valeur voisine de 85 dans l'air atmosphérique. On sait d'autre part, que l'argon est rigoureusement conservé au cours des transformations biologiques. L'argon trouvé ici provient donc d'air dissous dans l'eau qui imbibe la vase. La valeur trouvée ici, pour le rapport azote/argon (64) inférieure à la valeur normale dans l'air (85), nous montre que la proportion d'azote par rapport à l'argon est inférieure à ce qu'elle est dans l'air, donc que l'azote a été consommé et non produit. Notons cependant que les quantités d'argon étant peu élevées, le pourcentage n'est connu qu'avec une faible précision. Le rapport azote/argon ne saurait donc constituer un critère absolu, mais peut donner d'utiles indications.

Après cette première analyse, qui ne fournit qu'un résultat global, nous avons étudié le phénomène au laboratoire pour nous rendre compte de la dynamique de la production des gaz, et pour rechercher s'il n'était pas possible que l'azote gazeux soit d'abord produit, selon l'hypothèse de KUZNETZOV et ensuite fixé, pour revenir ainsi sous forme organique.

B - ETUDE AU LABORATOIRE

L'ensemble du protocole des essais est rassemblé dans le tableau I, présenté dans la partie "Matériel et Méthodes", que nous reproduisons ici. Nous avons ajouté diverses substances à la vase de façon à favoriser les dégagements gazeux. La figure 5 représente les fioles utilisées.

Les résultats des analyses des gaz recueillis au cours des expériences n° 1 à 10 figurent dans les tableaux XXXV à XLIV, sous forme de pourcentage de chaque gaz, dans les mélanges; ces tableaux seront commentés séparément par la suite. La figure 34 représente, pour chaque expérience,

NUMERO DE L'EXPERIENCE	PHASE SOLIDE		PHASE LIQUIDE	
	Origine de la vase	Poids, en g, de matière sèche	Composition	Volume en ml
1	La Rouillie. (bord de l'étang)	2,55	Urée 1g Glucose 1g Eau distillée 1000ml	50
2	La Rouillie. (bord de l'étang)	2,58	Asparagine 1g Eau distillée 1000ml	50
3	La Rouillie. (centre de l'étang)	6,77	Asparagine 1g Eau distillée 1000ml	50
4	La Rouillie. (centre de l'étang)	7,12	Glycocolle 1,140g Eau distillée 1000ml	50
5	La Rouillie. (centre de l'étang)	5,95	Glycocolle 5,357g Eau distillée 1000ml	50
6	Lac de Nantua	9,65	Glycocolle 5,357g Eau distillée 1000ml	50
7	La Rouillie. (centre de l'étang)	7,58	Glycocolle marqué 1,140 g (95 %) Eau distillée 1000ml	100
8	La Rouillie. (centre de l'étang)	1,17	Milieu "Viande-foie"	100
9	La Rouillie. (centre de l'étang)	7,58	Ca $(^{15}NO_3)_2$ 95 % 6g Eau distillée 1000ml	100
10	La Rouillie. (centre de l'étang)	6,77	Témoin Eau distillée	50

Tableau I - Récapitulation des expériences réalisées

le nombre de millilitres de gaz dégagés par gramme de matière sèche de la phase solide et par semaine d'incubation ; les proportions relatives en volume de CO_2, CH_4 et N_2 sont figurées par des hachures sur chaque histogramme.

1) Composition des mélanges gazeux

L'examen de la figure 34 permet de formuler quelques remarques :

- Le dégagement de gaz dans la fiole témoin (n°10) est inférieur au dégagement dans les fioles enrichies ;

- Avec le temps, le dégagement gazeux diminue dans les fioles enrichies alors qu'il augmente dans le témoin. On peut constater que le dégagement atteint un palier à peu près identique dans tous les cas, quelle que soit la phase liquide employée pour l'enrichissement ; ce palier est égal à 0,14 millilitres par gramme de matière sèche et par jour. Pour le témoin, la faiblesse du dégagement gazeux, au début, provient du temps que met la microflore de la phase solide à reconstituer un équilibre. Ce temps est écourté ailleurs, du fait de la présence d'un substrat facilement attaquable .

En présence de la phase liquide enrichie, les substances ajoutées donnent à la microflore un "coup de fouet" qui se manifeste par un dégagement gazeux plus important. Par la suite, ce dernier diminue et devient équivalent à celui observé chez le témoin ; la concentration en asparagine ou glycocolle, n'intervient pas sur le dégagement gazeux.

Les dégagements gazeux par gramme de matière sèche présentent des différences qui semblent provenir à la fois des phases solides et des phases liquides :

En ce qui concerne les phases solides, le tableau XLV permet d'expliquer ces différences : en effet, on peut admettre que le dégagement gazeux dépend de l'activité de la microflore qui se trouve elle-même en relation avec son importance numérique.

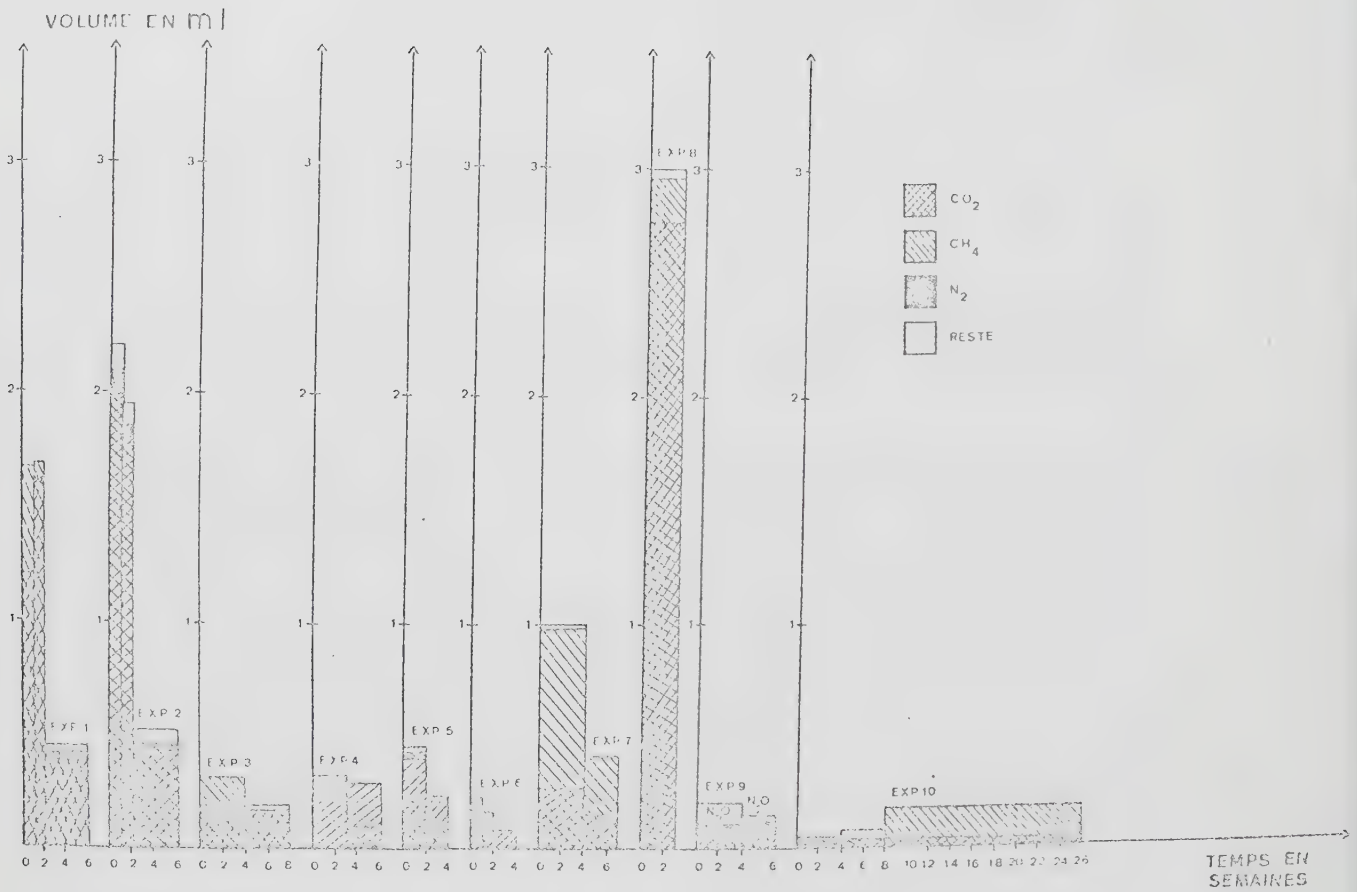


Fig. 34 - Volume (en ml) du mélange gazeux dégagé par gramme de matière sèche dans les dix expériences en fonction du temps (en semaines)

Les nombres de germes trouvés, par gramme de matière sèche, sont bien différents suivant les récipients, car on passe de 650 x 10^6 pour les n° 7, 8 et 9 à 140 x 10^6 pour 1 et 2, à 30 x 10^6 pour les n° 3, 4, 5 et 10 et enfin à 3 x 10^6 pour le n°6.

Quant aux phases liquides, comme on pouvait s'y attendre, le dégagement gazeux dépend de la substance ajoutée : le $Ca(15\ NO_3)_2$ favorise moins le phénomène que le glycocolle, tandis que le milieu viande-foie provoque un dégagement très important. Cela s'explique facilement par pouvoir stimulant différent des substrats ajoutés.

2) Evolution des teneurs en gaz carbonique, méthane et hydrogène dans les mélanges gazeux

Dans le dispositif témoin (tableau XLIV) on observe l'évolution suivante des composants du mélange gazeux : CO_2 augmente jusqu'au 69ème jour, puis diminue ensuite jusqu'au 180ème jour en passant de 62 % à 17 % du mélange, tandis que CH_4, faible jusqu'au 69ème jour, augmente ensuite brusquement pour atteindre 82,3 % au 180ème jour.

Le pourcentage de CO_2 (17 %) reste relativement élevé, ce qui montre que, à 28°C et dans des conditions de l'expérience, la transformation de CO_2 en CH_4 est lente ; il semble que l'échantillon témoin, au bout d'un certain temps d'incubation, arrive à une composition quantitative voisine de celle du mélange gazeux observé dans la nature.

Lorsqu'on ajoute l'azote sous une forme organique, les proportions relatives des gaz ci-dessus varient de la façon suivante :

- dans l'expérience n°1 (tableau XXXV) où nous avons ajouté de l'urée et du glucose, le gaz dégagé contient presque uniquement CO_2 et H_2 ; la proportion de CO_2 atteint 75 % pendant les 7 premiers jours, 95 % les 8 jours suivants ; ce n'est qu'entre le 15ème et le 52ème jour que commencent à apparaître de faibles quantités de N_2, provenant sans doute de l'air résiduel ayant persisté malgré le dégazage initial.

Temps d'incubation en jours	CO_2	CH_4	H_2	N_2	Reste	N_2/Ar
7	74,7	traces	25	0,3	-	-
15	95,5	traces	3,7	0,7	0,1	-
52	93,2	traces	4	2,3	0,5	75

Tableau XXXV - Pourcentages des différents gaz produits dans l'expérience n°1

Phase solide : Vase de l'étang de la Rouillie - M.S. = 2,58 g

Phase liquide: Enrichie (glucose 1 gl^{-1}, urée : 1 gl^{-1})

Temps d'incubation en jours	CO_2	CH_4	H_2	N_2	Reste	N_2/Ar
7	93,6	traces	2,2	4,1	0,1	-
15	87,6	traces	8,4	3,2	0,8	-
52	85,80	traces	12,9	1	0,3	90

Tableau XXXVI - Pourcentages des différents gaz produits dans l'expérience n°2.

Phase solide : Vase de l'étang de la Rouillie - M.S = 2,58 g

Phase liquide : Enrichie (asparagine 1 gl^{-1})

Temps d'incubation en jours	CO_2	CH_4	H_2	N_2	Reste	N_2/Ar
27	53,6	0,6	34,4	10,9	0,5	41
57	89,4	0,1	8,1	0,6	1,8	

Tableau XXXVII - Pourcentages des différents gaz produits dans l'expérience n°3.

Phase solide : Vase de l'étang de la Rouillie - M.S = 6,77 g

Phase liquide : Enrichie (asparagine 1 gl^{-1})

Temps d'incubation en jours	CO_2	CH_4	H_2	N_2	Reste	N_2/Ar
21	25,7	53,1	0,2	19,6	1,4	39
43	24,5	73,3	0,5	1,3	0,4	77

Tableau XXXVIII - Pourcentages des différents gaz produits dans l'expérience n°4.

Phase solide : Vase de l'étang de la Rouillie - M.S = 7,12 g

Phase liquide : Enrichie (glycocolle 1,140 gl^{-1})

Temps d'incubation en jours	CO_2	CH_4	H_2	N_2	Reste	N_2/Ar
15	46,8	42,3	0,3	8,1	2,5	39
32	43	55,2	0,2	0,4		

Tableau XIL - Pourcentages des différents gaz produits dans l'expérience n°5.

Phase solide : Vase de l'étang de la Rouillie - M.S = 5,95 g

Phase liquide : Enrichie (glycocolle 5,357 g).

Temps d'incubation en jours	CO_2	CH_4	H_2	N_2	Reste	N_2/Ar
8	63	0,9	traces	35,1	1	42
25	98,7	0,1	0,1	1	0,1	53

Tableau XL - Pourcentages des différents gaz produits dans l'expérience n°6.

Phase solide : Vase du lac de Nantua - M.S = 9,65 g

Phase liquide: Enrichie (glycocolle 5,357 gl^{-1})

Temps d'incubation en jours	CO_2	CH_4	H_2	N_2	Reste	N_2/Ar
31	27,1	72,6	traces	0,3	-	-
51	39	60,9	traces	traces	0,1	-

Tableau XLI - Pourcentages des différents gaz produits dans l'expérience n°7

Phase solide : Vase de l'étang de la Rouillie - M.S = 7,58 g

Phase liquide : Enrichie (95 % glycocolle marqué 1,14 gl^{-1})

Temps d'incubation en jours	CO_2	CH_4	H_2	N_2	Reste	N_2/Ar
22	92,2	6,1	0,5	0,24	0,96	-

Tableau XLII : Pourcentages des différents gaz produits dans l'expérience n°8.

Phase solide : Vase de l'étang de la Rouillie - M.S = 1,17 g

Phase liquide : Enrichie (milieu "viande-foie")

Temps d'incubation en jours	CO_2	CH_4	$^{15}N_2O$	$^{15}N_2$	Reste	N_2/Ar
31	28,5	traces	47,5	24,1	-	-
51	37,8	traces	21,1	41,1	-	-

Tableau XLIII - Pourcentages des différents gaz produits dans l'expérience n°9.

Phase solide : Vase de l'étang de la Rouillie - M.S = 7,58 g

Phase liquide : Enrichie Ca $(^{15}NO_3)2$ (95 %)

Temps d'incubation en jours	CO_2	CH_4	H_2	N_2	Reste	N_2/Ar
27	19,6	2,7	26,7	49,7	1,3	37
57	32,4	0,3	65,7	1,3	0,3	-
69	62,2	0,1	31,9	0,6	5,2	-
180	17,4	82,3	traces	traces	0,3	-

Tableau XLIV - Pourcentages des différents gaz produits dans le témoin (expérience n°10)

Phase solide : Vase de l'étang de la Rouillie - M.S = 6,77 g

Phase liquide : Eau distillée.

Types de vase	ETANG DE LA ROUILLIE			LAC DE NANTUA
	Bord de l'étang	Centre de l'étang	Centre de l'étang après conservation	
Nombre total de germes par gramme de matière sèche	140×10^6	14×10^6	650×10^6	3×10^6

Tableau XLV - Nombre de germes par gramme de matière sèche dans les différentes vases utilisées.

- dans les expériences n°2 et 3 (tableaux XXXVI et XXXVII - adjonction d'asparagine), la plus grande partie du mélange gazeux est constitué de CO_2. Au cours du temps, la teneur en CO_2 varie légérement dans un sens ou dans l'autre ; la teneur en H_2 a tendance à diminuer dans l'expérience n°3 ;

- dans les expériences 4, 5 et 7 (tableaux XXXVIII, XIL, XLI - adjonction de glycocolle), on observe une proportion importante de méthane : pour les phases solides provenant de l'étang de la Rouillie, l'adjonction de glycocolle au lieu d'asparagine a favorisé la production de méthane au détriment du gaz carbonique ;

- dans l'expérience n°6 (tableau XL - adjonction de glycocolle) où la phase solide est issue du lac de Nantua, la proportion de CO_2 est supérieure à 50 % et celle de CH_4 est faible : ceci montre bien que les proportions relatives de CO_2 et de CH_4 se situent sous la double dépendance de la phase solide et de la phase liquide et qu'un certain balancement existe ;

- dans l'expérience n°8 (tableau XLII - phase liquide : milieu viande-foie), il se produit une très grande quantité de gaz qui renferme surtout du CO_2 : l'ensemble des acides aminés présents a donc favorisé la production de CO_2 par rapport à celle de CH_4.

Quand l'azote est ajouté sous forme minérale (cas de l'expérience n°9 - Tableau XLIII) dans laquelle la phase liquide contient $(Ca^{15}NO_3)_2$, on obtient un mélange de 15 N_2O et 15 N_2, la proportion de 15 N_2 augmentant avec le temps d'incubation.

3) Azote gazeux - Rapport azote/argon

Le rapport azote/argon a été calculé dans la plupart des expériences : lorsqu'on décèle l'argon dans les mélanges gazeux, il provient sans doute d'air atmosphérique dissous dans le milieu ou retenu dans les particules végétales de la vase et qui n'a pu être éliminé complétement par dégazage en début d'expérience. Si, à la fin de l'incubation, la

quantité d'azote augmente par rapport à la quantité initiale présente dans l'air non expulsé, le rapport azote/argon sera supérieur à 85 (valeur pour l'air). Si la quantité d'azote diminue comparativement à la quantité initiale, le rapport azote/argon sera inférieur à 85.

Dans les expériences 1, 2, 3, 4, 5 et 6, l'azote a été introduit sous forme d'urée, d'asparagine et de glycocolle ; partout de petites quantités d'azote ont été trouvées dans le mélange gazeux, mais le rapport azote/argon demeure toujours inférieur à 85, sauf dans l'expérience n°2 où il est très légèrement supérieur. On pourrait donc se demander si l'azote provient uniquement de l'air présent dans le milieu, ou en partie de la matière organique ajoutée. Pour lever cette incertitude, du glycocolle marqué à l'azote lourd a été utilisé dans l'expérience n°7 ; on n'a pas pu démontrer la présence de l'azote lourd gazeux dans le mélange prélevé après incubation ; dans l'expérience n°8, le milieu viande-foie a également été employé comme source de la plupart des acides aminés, là, la proportion d'azote gazeux dégagé est très faible. Dans toutes les expériences, à l'exception de n°9 (adjonction de $Ca^{15}NO_3)_2$, on a mis en évidence la présence de NH_4 dans le milieu.

C - DISCUSSION

Les valeurs absolues des dégagements gazeux obtenus par les divers auteurs sont difficilement comparables entre elles, car les sols ou vases utilisées sont très différents. KUZNETZOW (1959) présente des analyses de gaz produits par les vases de divers lacs et étangs dans maintes conditions d'incubation (aérobiose ou anaérobiose). Chaque fois, il observe une diminution du dégagement gazeux avec le temps (la diminution est beaucoup plus rapide lorsqu'il s'agit de vase incubée en anaérobiose). BELL (1969) analyse les gaz dégagés par des sols incubés en milieu aqueux ; les substances suivantes, glucose, peptone et cellulose sont respectivement ajoutées au sol. Dans toutes les expériences, la production de gaz est importante au début de l'incubation, puis diminue

beaucoup jusqu'à devenir très faible au bout de 125 jours ; l'auteur a cependant noté l'existence d'un temps de latence au début de l'incubation. L'allure du phénomène est analogue à celle que nous avons observée : la production de gaz est importante au début des expériences, puis on assiste à un ralentissement qui, pour le témoin, tend vers une valeur constante. Dans les autres cas, l'expérience n'a pas duré assez longtemps pour permettre l'établissement du palier.

En ce qui concerne la composition des mélanges gazeux, méthane, hydrogène, gaz carbonique sont les trois principaux gaz dégagés par les bactéries anaérobies (BARKER, 1949) ; ils ne sont pas indépendants puisque CH_4 provient de la réduction de CO_2 sous l'action directe de H_2 issu de composés organiques. YAMANE et SATO (1964), en travaillant sur des sols enrichis en glucose (humidité 20 %), ont observé un dégagement composé presque uniquement de CO_2 et H_2 jusqu'au 14ème jour ; ensuite, suivant les quantités de glucose ajoutées, CH_4 apparaît entre le 14ème et le 20ème jour. BELL (1969), sur des sols saturés d'eau enrichis en glucose, a également noté un dégagement de H_2 important les 4 premiers jours, puis une apparition de CO_2 et de CH_4 ; après le 40ème jour, la proportion de CO_2 diminue et celle de CH_4 augmente ; la quantité d'azote produite est très faible (environ 1 %) ; sur des sols enrichis en peptone, le taux de CH_4 atteint 80 %. Ce même taux a été trouvé par KUZNETZOW (1959) avec des vases non enrichies.

Dans nos expériences, il n'est pas possible de comparer le volume du gaz prélevé dans l'étang aux autres volumes, car on ne peut pas le rapporter à une masse de phase solide précise. Cependant, on remarque que dans les gaz recueillis tant dans le flacon témoin que dans l'étang, le rapport azote/argon reste supérieur à celui de l'air, ce qui permet d'admettre une consommation d'azote gazeux plutôt qu'une production. Cette consommation peut être le fait des micro-organismes anaérobies fixateurs d'azote. La possibilité d'obtenir de l'azote gazeux à partir de l'azote organique est incertaine, mais non impensable : chaque vase et chaque bactérie réagissant d'une manière spécifique.

D - CONCLUSION

L'étude réalisée dans le but d'étudier le dégagement d'azote gazeux à partir d'azote organique a permis, non seulement d'éclaircir ce point essentiel, mais aussi d'obtenir des précisions sur la nature et l'intensité des dégagements gazeux dans les vases :

- le gaz carbonique (CO_2), le méthane (CH_4) et l'hydrogène (H_2) sont les trois gaz formés en quantités appréciables par les bactéries anaérobies ; d'autres gaz existent en petite quantité : hydrogène sulfuré(H_2S), oxygène (O_2). Sans doute ce dernier provient-il de l'air restant dans le milieu. Le volume de gaz libéré dépend de la quantité et de la nature de la phase solide ainsi que de la nature de la phase liquide ; il semble que, dans toutes les expériences, la substance ajoutée se trouve en quantité suffisamment importante pour ne pas être un facteur limitant. L'adjonction à la vase d'une substance facilement dégradable entraîne une production importante de gaz ; au bout d'un certain temps, cette production diminue. On observe une corrélation directe entre le nombre de germes de la phase solide et le dégagement gazeux ;

- les divers mélanges gazeux analysés ici sont semblables au point de vue qualitatif. Cependant, certains éléments ne se présentent parfois qu'à l'état de traces. Les travaux précédents, effectués à l'aide de méthodes d'analyses moins précises, n'avaient pas mentionné certains gaz, vraisemblablement présents, mais en trop faible proportion pour être détectés avec les moyens jusqu'alors utilisés. Les proportions relatives des divers gaz varient,d'une part suivant le milieu et la vase étudiée, et, d'autre part selon le temps d'incubation. Dans presque toutes les expériences de décomposition d'acides aminés, la proportion de méthane augmente avec le temps ainsi que la proportion d'hydrogène, en particulier dans le témoin (tableau XLIV) où le méthane, entre le 70ème et le 180ème jour, passe de 0,1 % à 82,3 %. Ceci est logique, car la proportion de méthane croît à partir du moment où le milieu devient plus réducteur et évolue depuis longtemps en absence d'oxygène. De même, dans la réduction des nitrates, la proportion de N_2 augmente au cours du temps ;

- en ce qui concerne l'azote, les rapports azote/argon nous montrent, dans la plupart des cas, une consommation d'azote dans les mélanges analysés. L'azote trouvé dans le mélange provient certainement de l'air qui a échappé au dégazage ; en effet, de nombreuses bulles microscopiques restent emprisonnées à l'intérieur des parois et des tissus végétaux et il est impossible de provoquer le départ, même en soumettant le contenu de la fiole à un vide poussé pendant une durée de vingt minutes ; lors de l'incubation, le végétal se décompose plus rapidement, l'air est libéré, l'oxygène très rapidement consommé et il reste l'azote et l'argon. Malgré les difficultés rencontrées lors des dégazages, il apparaît que, dans nos conditions expérimentales voisines des conditions naturelles, le dégagement d'azote est d'une importance très faible. L'adjonction d'azote lourd sous forme organique (glycocolle marqué) ne nous a pas permis de mettre en évidence la moindre trace d'azote lourd gazeux dans le mélange dégagé ; seule l'adjonction d'azote nitrique lourd ($^{15}NO_3$)$_2$Ca a été suivie d'un dégagement appréciable d'azote lourd gazeux. L'azote dégagé peut donc provenir d'un processus de dénitrification.

Il semble donc que, vu les faibles quantités d'azote gazeux trouvées dans la plupart des cas et compte tenu des conditions de nos expériences, la production d'azote gazeux à partir d'azote organique n'ait pas une grande importance écologique dans les échantillons que nous avons étudiés et que l'hypothèse de pertes d'azote par cette voie, ne soit pas à retenir.

CONCLUSIONS GENERALES

Les connaissances sur les grands cycles biologiques naturels, et en particulier le cycle de l'azote, sont, dans les écosystèmes aquatiques, loin du niveau qu'elles ont atteint dans les sols. Aussi a-t-il paru nécessaire d'approfondir ces problèmes et d'orienter nos recherches vers le cycle de l'azote dans les eaux stagnantes.

En raison des particularités même du milieu aquatique, l'étude a porté sur les points suivants : échanges entre la vase et l'eau, conditions de la vie bactérienne en présence d'un taux de matière organique important (environ 20 % de la matière sèche de la vase), dans un milieu imbibé d'eau et pauvre en oxygène. Pour des raisons ainsi évoquées, il n'est pas possible d'appliquer directement aux vases les connaissances relatives aux sols ; aussi, dans nos recherches, avons-nous présente à l'esprit l'idée de comparaison entre les vases et les sols, de façon à déterminer les analogies ou les différences entre les deux milieux.

L'historique bibliographique des connaissances rassemblées sur les cycles biologiques dans les vases et les eaux a permis de dégager un certain nombre de points peu étudiés jusqu'à ces dernières années. L'examen d'un certain nombre de vases destiné à mettre en évidence les rapports entre les caractéristiques physiques et chimiques essentielles d'une part, et les groupes physiologiques intervenant

dans les grands cycles biologiques d'autre part, révèle l'influence positive de la matière organique sur l'ensemble de la microflore. L'attention est également attirée sur quelques uns des problèmes se posant dans le cycle de l'azote à propos des nitrates : nitrification dans les conditions écologiques particulières régnant dans les vases, devenir de l'azote nitrique. Il nous a semblé nécessaire de poursuivre nos recherches à la fois "in situ" et au laboratoire, de façon à pouvoir interpréter les phénomènes observés dans la nature à l'aide des résultats de l'expérimentation au laboratoire, où l'on peut réaliser la maitrise de la plupart des facteurs écologiques.

L'étude comparée de deux étangs, différents par leur situation géographique et climatique, au cours d'un cycle annuel et en s'attachant particulièrement au cycle de l'azote, a été interprétée à la fois à l'aide de l'analyse classique (comparaison de graphiques obtenus en portant en abscisse les mois de l'année, et en ordonnées les valeurs mesurées de chacun des facteurs étudiés) et de l'analyse mathématique. L'analyse classique a permis de mettre en évidence les phènomènes les plus visibles : concordance entre les variations de la température et celles des différents groupes physiologiques bactériens, en particulier celui des ammonifiants, et opposition entre la teneur en NH_4^+ et la température. Le comportement des nitrates semble différent dans l'eau et dans la vase sans qu'il soit possible d'aller plus loin dans l'interprétation. L'analyse mathématique effectuée ensuite a permis par ces résultats de compléter la vision des phénomènes : l'opposition entre la teneur en NH_4^+ d'une part, et la température et le nombre de germes ammonifiants d'autre part, s'est trouvée confirmée dans les deux étangs, dans la vase comme dans l'eau. Ce fait nous a suggéré l'hypothèse de la réorganisation de l'azote ammoniacal au cours des mois d'été. En outre, nous avons pu formuler l'hypothèse de l'existence d'une nitrification hétérotrophe et ceci n'était guère possible après l'analyse classique ; en effet, l'indépendance des variables, azote ammoniacal et azote nitrique, et la dépendance entre azote nitrique et matière dans les vases, montrent qu'il doit exister une nitrification aux dépens de la matière organique.

A propos de l'interprétation des résultats de l'étude écologique sur les deux étangs, on peut souligner l'intérêt des méthodes mathématiques d'analyse par le calcul automatique. Sans tomber dans le travers de considérer l'analyse mathématique comme un but et une fin en soi, il semble que, si elle n'est pas indispensable dans le cas de phènomènes particulièrement évidents, elle peut permettre à l'écologiste d'aller plus loin dans l'interprétation de ses observations. Cependant, pour connaître le mécanisme des phénomènes, il est nécessaire d'effectuer les vérifications expérimentales des hypothèses suggérées par l'analyse précise des observations sur le terrain.

L'importance des phènomènes qui s'attachent au devenir de l'azote nitrique, nous a conduit à les étudier en étang et au laboratoire. Après adjonction d'azote nitrique, nous avons constaté une augmentation importante du nombre de germes dénitrifiants ainsi qu'une baisse du taux des nitrates. Cette diminution ne s'est pas accompagnée d'une augmentation de la teneur en azote ammoniacal, lequel n'a pas été non plus décelé dans les tubes servant à dénombrer les germes dénitrifiants. Il semble donc bien, et ceci confirme les observations de RODINA (1958), que l'introduction d'engrais nitriques n'entraîne pas de bénéfice pour l'économie de l'étang, puisque l'azote est rapidement transformé en azote gazeux. Or, l'azote gazeux provenant de l'air dissous atteint pratiquement toujours la valeur de saturation dans l'eau : l'azote gazeux supplémentaire de dénitrification s'échappe dans l'atmosphère et est ainsi inutilisé.

La décomposition de l'azote organique aboutit à la formation d'azote ammoniacal. Dans les conditions expérimentales où nous avons opéré (absence de lumière, donc absence d'algues), ce dernier s'accumule dans l'eau ; ceci confirme bien "a contrario" l'hypothèse annoncée à la suite de l'étude écologique de la réorganisation importante de l'azote ammoniacal par les algues au cours de la saison de végétation ; nous trouvons là un bel exemple d'un processus qui, à première vue parait se dérouler de façon différente "in situ" et au laboratoire : on assiste en effet, respectivement, à une diminution et à une augmentation de la teneur en azote ammoniacal, alors qu'en

fait, le phènomène est le même, mais que sur le terrain l'azote ammoniacal est réorganisé par les algues et qu'au laboratoire, en l'absence d'algues, il s'accumule.

La quantité d'azote minéral utilisable dans l'eau par les végétaux (plancton et phanérogames) et,par là, bénéficiant aux organismes supérieurs, est faible en regard de la quantité d'azote organique ajoutée à la vase (7,7 %). Il semble donc que ce procédé de fertilisation ne soit rentable que dans le cas extrêmes de vases très pauvres en matière organique.

Les modalités du passage de l'azote ammoniacal et de l'azote organique à l'azote nitrique constituent le propos de l'étude de la nitrification autotrophe et hétérotrophe ; il en ressort d'une façon nette, la prédominance de la nitrification hétérotrophe au moins dans les vases ; l'étude écologique suggère la différence du comportement de l'eau et de la vase vis-à-vis de la nitrification : dans l'eau, milieu plus riche en oxygène, la nitrification a lieu surtout à partir de NH_4^+, donc, à prédominance autotrophe, alors que dans la vase, elle a lieu principalement à partir de matière organique, donc à prédominance hétérotrophe. L'étude au laboratoire, par la méthode des passages, a permis de montrer la baisse de la production de nitrates corrélativement à une baisse de la teneur en matière organique, dans un milieu à potentiel redox bas (rH = 12). L'étude de la physiologie des germes du genre Arthrobacter, a mis en évidence leur rôle dans la nitrification hétérotrophe : ils sont capables de nitrifier à partir de matière organique et de restituer à la vase stérilisée, puis inoculée, ses propriétés nitrifiantes. Le seuil thermique d'action des Arthrobacter est situé à 12 degrés centigrade. En dessous de cette température, et dans des vases très réductrices, il semble que la nitrification n'ait pas lieu.

La faible quantité d'azote minéral apparue par rapport à l'azote organique ajouté, peut provenir de transformations aboutissant à la formation d'azote gazeux. L'étude des gaz dégagés par les vases

est destinée à élucider les causes d'imprécisions des bilans d'azote, en particulier en recherchant si l'azote gazeux peut être produit directement à partir de matière organique azotée : l'urée, l'asparagine, le glycocolle et le glycocolle marqué à l'azote lourd ont été utilisés comme substrat azotés et ajoutés à la vase. Dans aucun des cas étudiés, on n'a pu constater de dégagement d'azote gazeux provenant de la matière organique. Il semble donc bien que la production d'azote gazeux, à partir d'azote organique, n'ait pas lieu dans les conditions écologiques régnant dans les vases. On a pu également ici, montrer que l'adjonction d'azote nitrique lourd à la vase, entraîne une production importante d'azote gazeux lourd, ce qui montre bien que dans les vases, la dénitrification est désassimilatrice.

Nous avons perçu, au cours de nos recherches, l'importance de la microflore algale, et, se trouve ainsi abordé le sujet immense des interactions entre les algues et les bactéries. Il semble que des voies de recherches peuvent être envisagées dans un certain nombre de domaines : forme d'azote minéral utilisée préférentiellement par les algues, étude du rôle favorable ou toxique pour les bactéries des substances émises par les algues ; de la même manière, rôle des bactéries vis-à-vis des algues.

Une constatation d'ordre général s'impose d'une manière frappante : dans les eaux stagnantes, la matière organique a tendance à s'accumuler sous forme de vase et nos efforts doivent tendre à freiner cette accumulation et à remettre dans le circuit biologique de la masse d'eau, les éléments bloqués dans la vase. Aussi, avons-nous orienté nos travaux vers l'étude des facteurs accélérant la minéralisation de la matière organique de la vase, et en particulier le carbonate de calcium.

BIBLIOGRAPHIE

ALEXANDER (M.), MARSHALL (K.L.), and HIRSCH (P.). Autotrophy and heterotrophy in nitrification. Proc. int. Cong. Soil Sci., Madison, 1960, 2, 586-591.

BARKER (H.A.). Métabolisme des gaz par les bactéries anaérobies. Annls. Inst. Pasteur, Paris, 1949, 77, 4, 361-379.

BELL (R.G.). Studies on the decomposition of organic matter in flooded soil. Soil. Biol. Biochem, 1969, 1, 2, 105-116.

BOON (B.) and LANDELOUT (H.). Kinetics of nitrite oxidation by Nitrobacter winogradskyi., Biochem.J., 1962, 85, 440-447.

BRAUNE (W.) et UHLEMANN (R.). Studien zum Einflussder temperatur auf ammonifikation und nitrifikation in Flusswasser. Int. Rev. Ges. Hydrobiol., 53, 3, 453-468, 1968.

BRISOU (J.). Le Bathyrophe. Cah. Océanogr., 1965, 17, 53-54.

BRISOU (J.) et VARGUES (H.). Relations entre groupes physiologiques microbiens hétérotrophes et processus de nitrosation. C.R. Soc. Biol., 1962, 8 et 9, 1487.

BROADBENT (F.C.). Interchange between inorganic and organic nitrogen in soils Hilgardia, 1966, 37, 165-180.

BROOK (T.P.). Principles of microbiol ecology. Prentice Hall, New Jersey, 1966.

CALANDRON (A.), DUPUIS (G.), RENAULT (M.), POCHON (P.), FALCOU-SIGRAND(S.) Etude chimique et bactériologique de vases fluviomarines. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1962, 103, 392-402.

CHAIGNEAU (M.), BORY (J.), LE MOAN (G.) et LABARRE (C.). Composition des gaz dégagés par Clostridium septicum cultivé en milieu au thioglycolate. C.R. hedd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 1965, 262, 2403-2406.

CHEN (H.K.) et CHOU (C.). La nitrification anaérobie facultative et les organismes nitreux. Int. Cong. Soil. Sci., Bucarest, 1964, 9, 194-195.

COOPER (B.A.). The bottom sediments of lake Lanzo.II. Bacteriological investigations. Rev. Canad. Biol., 1953, 12, 457-494.

CORBERI(E.)et SOLAIN (A.). Osservazioni sulla microflora delle acque del lago Maggiore. Ann. Microbiol. Enzymiol., 1960, 10, 36-56.

DOMMERGUES (Y.). Contribution à l'étude de la dynamique microbienne des sols en zone semi-acide et en zone tropicale sèche. (Thèse Fac. Sciences, Paris). Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1962.

DUCHAUFOUR (Ph.). Précis de Pédologie. MASSON & Cie. Paris, 1960.

EKMAN (S.). Uber cinen neuen Bodengreifer für marin-zoologische Zwecke. Int. Rev. ges. Hydrobiol. Hydrogr., 1933, 28, 312-329.

ENGEL (H.). Liefert die chemosynthese von Nitrobacter winogradskyi freien Sauesrstoff. Z. NaturForsch., 1962, 17 b, 91-92.

ENGEL (H.) und SCHON (G.). Das Verhalten von Nitrobacter winogradskyi Buch gegenüber erhöhten CO_2. Partialdrück. Z. NaturForsch., 1964, 19 b, 51-54.

FEUILLADE (J.). Contribution à l'étude d'un lac de barrage : le lac de Vézins (Manche). Thèse doct. Fac. Sci., Caen, 1965.

FEUILLADE (J.) et LAURENT (M.). Essai d'une méthode d'investigation pour l'étude du cycle de l'azote dans les étangs. Rech. Hydrobiol. contin., 1969, 1, 5-21.

FROLOVA (L.F.). Propriétés antibiotiques de la vase du lac Balpach-Sor (en russe). Trudi Inst. Kraevoi Pathol., 1959, 7, 73-81

GAMBARIAN (M.E.). Assimilation of molecular nitrogen in the water and grounds of the Sevan lake. Mikrobiologiya, 1958, 27, 366-370.

GEHU (J.M.) et GHESTEM (A.). La minéralisation expérimentale de l'azote organique de deux systèmes pédobiologiques littoraux naturels (dunes et prés salés). Annls. Inst. Pasteur, Paris, 1965, 109, Suppl. n°3, 136-152.

GENOVESE (S.) e MACRI (G.). Determinazioni di alcuni grupi fisiologici di batteri in campioni di acqua e di fango del lago di Ganzirri. Atti Soc. Peloritana Sc. fis. nat., 1964, 10,81-95.

GENOVESE (S.), MACRI (G.) e SCAVUZZO (C.). Contributo all studio della nitrificazione nell ambiente salmastro. Boll. Pesca Piscic. Idrobiol., 1966, 21, 2, 273-286.

GOLTERMAN (H.L.). Influence of the mud on the chemistry of water in relatic to productivity in chenical environment in the aquatic habitat (M.L. GOLTERMAN et R.S. CLYMO ed., 1967, 197-313, NV NOOR-HOLLANDSC Moatschappij, Amsterdam.

GOUNOT (A.M.). Rôle biologique des Arthrobacter dans les limons souterrains Ann. Inst. Pasteur, 1967, 113, 923-945.

GUNNER (H.B.). Nitrification by Arthrobacter globiformis. Nature, 1963, 197 1127-1128.

HUTCHINSON (G.E.). A treatise on Limnology. I, John Wiley & sons. New York, 1957.

IVANOV (M.V.) et TEREBLOKAL (S.). On microbiological processus of hydrogen sulphide formation in the Solenoe lake. Mikrobiologiya, 1959, 28, 413-418.

JANSSON (S.L.). Nitrogen transformation in soil. Kungl. Lantbrugshögsk. Annls., 1958, 24, 101-361.

JOBIN, YVON. Dosages des acides aminés au spectrophotomètre "Maroc" (Méthode Yemm et Cocking, modifiée). Bull. Instrumental Jobin et Yvon, 1964, 39, 8-9.

KAISER (P.). Etude de l'activité pectinolytique du sol. (Thèse Fac. Sciences Paris), 1961.

KAISER (P.) et LAURENT (M.). Evaluation des groupements fonctionnels dans cinq sédiments humiques d'eau douce. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1964, 107, suppl. 3, 152-167.

KALINENKO (V.O.). Bactéries hétérotrophes nitrifiantes (en russe). Potschwowedene, 1948, 6, 357-363.

KUZNETZOV (S.I.) et CHARTULARI (L.M.). Les caractéristiques microbiologiques dues au processus de décomposition anaérobie de la matière organique de la vase du lac Blanc à Kossino. Mikrobiologija, 1941, 10, 7-37 (en russe).

KUZNETZOV (S.I.). Die Rolle der Mikroorganisms in Stoffkreislauf der Seen. 1959, 1 vol., VEB Deutsche Verlag der Wissenschaften, Berlin.

KUZNETZOV (S.I.). Recent studies on the role of microorganisms in the cycling of substances in lakes. Limnol. and Ocean., 1968, 13, 2, 211-224.

LABARRE (C.), CHAIGNEAU (M.), BORY (J.) et LE MOAN (G.). Composition des gaz dégagés par Clostridium sporogenes et Clostridium septicum cultivés en milieu au thioglycolate. C.R. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 1966, 262, 2550-2553.

LAURENT (M.). Note sur la numération globale des bactéries dans les vases d'eau douce. Ann. Inst. Pasteur, 1964, 107, 433-436.

LAURENT (M.). Note sur les techniques d'ensemencement pour l'étude microbiologique des vases et des eaux. Biol. Sol. Bull. Int. Inf., 1965, 3, 29-32.

LAURENT (M.). La nitrification autotrophe et hétérotrophe dans les écosystèmes aquatiques. Annls. Inst. Pasteur, Paris, 1971, 121, 795-810.

LEBART (L.) et FENELON (J.P.). Statistique et informatique appliquées. 1971, 1 vol. Dunod Ed., Paris.

LE MOAN (G), LABARRE (C.), CHAIGNEAU (M.) et BORY (J.). Composition des gaz dégagés par Clostridium Hisalytium cultivé en milieu au thioglycolate. C.R. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 1966, 262, 1906-1909.

LIALIKOVA (N.N.). Quelques propriétés de la microflore des dépots de boue influant sur la qualité thermale de ces boues (en russe). Trydi. Inst. Mikrobiol., 1955, 4, 202-206.

LOCHEAD (A.G.). Qualitative studies of soil microorganisms : copability of the predominant bacteria glow for synthesis of various growth factors. Soil. Sci., 1957, 84, 395-403.

LOEHNIS (P.) et GREEN (M.). Ammonification in soiłs and solutions. Zbl. f. Bakt., 1914, 11, 37, 534-550.

MALAVOLTA (E.), CROCOMO (O.J.) et DELWICHE (C.C.). Fixacao do dioxido de carbono por bacterias nitrificantes. Int. Amer. Symp. peaceful Appl. Energy, Valparaiso , Chili, 1964, Washington Pan amer. Univer., 1965, 285-289.

MEKHTIEVA (L.N.). Distribution de la microflore dans les sédiments récents du grand lac Sevan. Mikrobiologiya, 1963, 32, 113-120.

MICHOUSTINE (M.E.). Le processus de la dénitrification et les pertes d'azote par le sol. Annls. Inst. Pasteur, Paris, 1965, 109, 3, 235-247.

MORTIMER (C.H.). The exchange of dissolved substances between mud and water in lakes. J. Ecol., 1941, 29, 280-329.

MORTIMER (C.H.). The exchange of dissolved substances between mud and water in lakes. J. Ecol., 1942, 30, 147-201.

MULDER (F.G.) et ANTHEUNISSE (J.). Morphologie, physiologie et écologie des Arthrobacter. Ann. Inst. Pasteur, 1963, 105, 46-74.

NOVAK (R.) and WILSON (P.W.). The utilization of Nitrogen in hydroxylamine and oximes by Azotobacter vinelandi. J. Bact., 1962, 55, 517-526.

NOVOJILOVA (M.I.). Caractéristiques microbiologiques du lac Balpach-Sor (en russe). Trydi Inst. Kraevoi Pathol., 1959, 7, 64-72.

OBATON (M.). Exposé "la nitrification hétérotrophe", I.N.R.A., Microbiolog du sol, Versailles, roméotypé, 1966.

OHLE (W.). Der Stoffhaushalt der Seen als Grundlage einer allgemeinen Stoffwechsel - Dynamik der Gewässer. Kieller Meeresforsch, 1962, 3,107-120

OMELIANSKI (N.L.). Uber die Methanbildung in der natur bei der biologischen prozessen. Zbl. J. Bakt., 1906, 15, 2, 673-698.

OVERBECK (J.). Primärproducktion und gewässerbakterien. Naturwissenchoften 1965, 51, 6, 145-146.

PICHINOTY (F.). L'inhibition par l'oxygène de la dénitrification bactérienne. Annls. Inst. Pasteur, Paris, 1965, 109, 3, 248-256.

POCHON (J.) et TCHAN (Y.T.). Recherches sur les phénomènes biologiques d'ammonification dans les sols. Annls. Inst. Pasteur, Paris, 1947 a, 73, 696-700.

POCHON (J.), TCHAN (Y.T.), CHALVIGNAC (M.A.) et CHALAUST (R.). Recherches sur les processus biologiques d'ammonification dans les sols. II Ammonification et humification dans les terrains sableux. Annls. Inst. Pasteur, Paris, 1947 b, 73, 1118-1121.

POCHON (J.) et DE BARJAC (H.). Traité de Microbiologie des sols. DUNOD, Paris, 1958.

POCHON (J.) et TARDIEUX (X.). Techniques d'analyse en microbiologie du sol. La Tourelle, Ed., Saint-Mandé, 1962.

PREVOT (A.R.). Recherches sur la flore anaérobie des boues méthanogènes naturelles. C.R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 1946, 222, 296-297.

PREVOT (A.R.). Techniques pour le diagnostic des bactéries anaérobies. La Tourelle, St-Mandé - France, 1960.

PROVALOSI (L.) et PINTER (I.J.). Artificial media for fresh-water algae. In : The ecology of algae, 2d Pymatuning Symposium in ecology, University of Pittsburg ed., 1959, 84-96.

RHEINHEIMER (G.). Untersunchungen über den Einfluss der temperatur auf die Nitrification im Elbe-Aestuar. Arch. Mikrobiol., 1964, 49, 283-290.

RHEINHEIMER (G.). Der Jahresgang der Nitrit,und Nitrat-bakterienzahl im Wasser der Elbe bei Bleckede. Kieler Meeresforsch., 1965, 21, 122-123.

ROBINSON (J.R.) and THOMPSON (T.G.). The determination of nitrites in sea water J. Mar. Res., 1948, 7, 42-48.

RODIER (J.). L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau. Dunod, Paris, 1960.

RODINA (A.G.). Engrais azotés et dénitrification dans les étangs de pisciculture (en russe). Trudy Inst. Biol. Riga, 1958, 7, 43-60.

RODINA (A.G.). Etudes microbiologiques des Etangs de Rybtzevo (Krasnodar). Trudy Zool. Akod. Nank. URSS, 1959, 26, 129-219.

RODINA (A.G.). Microbiology of activitiés of lake. Limnol. Oceanogr., 1964, 8, 388-393.

RODINA (A.G.). Methodes en microbiologie des eaux (en russe). Nauka ed. Moscou, 19

RODINA (A.G.). Variety and destruction of lake detritus. Mitt. int. Verein. theor angew. Limnol., 1966, 16, 3, 1513-1517.

RÜTTNER (F.). Fundamentals of Limnology translated by O.G. Frey and F.E.J. Frey. 2e ed. Toronto.Univer. Toronto Press., 1953.

SAVOURE (B.). Contribution à la biologie des algues d'eau douce d'un étang breton. I le milieu naturel. Annls. Limnol., 1969, 5, 2, 85-122.

SCHLEGEL (H.G.) et PFENNIG (M.). Die Anreicherungskultur einiger Schwefelpurpurbakterien. Arch. Mikrobiol., 1961, 38, 1-39.

SCHÖBERL (P.) and ENGEL (H.). Das Verhalten der nitrifizierenden Bakterien gegenüber gelöstem Sauerstoff. Arch. Mikrobiol., 1964, 48, 393-400.

SEBALD (M.). Etude quantitative de la lipidolyse bactérienne dans le sol. C.R. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 1959, 248, 3363-3365.

SIERRA (G.). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrats. Antonie van Loewenheck, 1957, 23, 15-22.

SIMON (G.). L'enfouissement des pailles dans le sol. Annls. Agron., 1960, 11, 177-219.

STUMM (W.). Redox potential as an environmental parameter ; conceptual significance and operational limitation. In O. Jaag and H. Liebmann, Advances in waterpollution research. Proc. 3rd Int. Conf., 1965, Munich, col. 1, 283-308, Wat. Poll. control. Fed. Washington. 1966.

TANDON (G.) and RASTOGI (M.). Effect of organic substances on nitrification by Nitrosomonas. I, Proc. nat. Acad. Sci. India, 1965, 35, n°1, 29-36.

THIENNEMANN (A.). Der Nahrungskreislauf im Wasser. Verh. Dtsch. Zool. Ges. (Zool. Anz. Suppl., Bd.2.) 1926, 31, 29-79.

TYSSET (C.) et MOREAU (R.). Etude bactériologique complémentaire des boues du port d'Alger. Arch. Inst. Pasteur, Algérie, 1963, 41, n° 1-2, 19-40.

VACELET (E.). Rôle des populations phytoplanctoniques et bactériennes dans le cycle du Phosphore et de l'Azote dans l'eau de mer littorale et les flaques supralittorales à salinité variable du Golfe de Marseille. Thèse Fac. Sci., Aix-Marseille, 1967.

VAN MEEL (L.). Etudes limnologiques en Belgique. VII. Essai d'un cycle biologique annuel dans un système de cinq bassins d'eau douce à courant lent dérivant du canal Albert. A. Etude des milieux. Bull. Inst. r. Sci. Nat. Belg., 1971, 47, 27, 1-114.

VAN SCHREVEN (D.A.). Quelques aspects microbiologiques du métabolisme de l'azote dans le sol. Annls. Inst. Pasteur, Paris, 1965, 109, Suppl. N°3, 19-49.

WATSON (S.W.) Characteristics of a marine nitrifiying bacterium, Nitrosocystis oceanus sp. n. Limnol. Oceanogr., 1965, 10, 274-289.

WIERINGA (K.T.). On the dissimilation of pectic substances in nature. Congrès Intern. Microbiol., Rome, 1953, 6, 281-282.

WOLDENDORP (J.W.). Formation d'ammoniaque dans le sol au cours de la réduction des nitrates. Annls. Inst. Pasteur, Paris, 1965, 109, Suppl., n°3, 316-327.

WROBEL (S.). The bottom deposits im Dam reservoirs at Roznow and Czchow in Limnological investigations in the Tatra mountains and Dunoyec river basin. Université Jagellon, Cracovie, ed., 1965.

WURTZ (A.). Champignons, bactéries et algues des eaux polluées. Bull. Franç. Pisci.,1956, 182, 5-25, 184, 89-119.

WURTZ (A.). Mesures chimiques ou physico-chimiques dans la vase et dans l'eau des étangs. Ann. Sta. Centr. Hydrobiol. app., 1962, 9, 247-286.

YAMANE (I.) and SATO (K.). Decomposition of glucose and gaz formation in flodded soil. Soil. Pl. Fd., Tokyo, 1964, 10,3, 35-41.

TABLE DES MATIERES

xxxxxxxxxxxxxxx

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION 1

ETAT ACTUEL DU PROBLEME 4

MATERIEL ET METHODES 17

A - LES DIFFERENTS BIOTOPES ETUDIES 17
- Etang de la Rouillie 17
- Etang de Soustons 17
- Autres biotopes 18

B - PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS 20
1) Sédiment 20
2) Eau 23

C - ETUDE ECOLOGIQUE DE DEUX ETANGS : La Rouillie et Soustons .. 23

D - DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX ET MISE EN OEUVRE 24
1) Devenir de l'azote nitrique 24
2) Décomposition de la matière organique 28
3) Nitrification autotrophe et hétérotrophe 29
4) Gaz dégagés par les sédiments 32

E - DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES PHYSIQUES 37

F - ANALYSES CHIMIQUES 40

G - ETUDES MICROBIOLOGIQUES 42
1) Conditions d'ensemencement sur le terrain - Dénombrement des germes 42
2) Microflore totale 43
3) Groupes physiologiques 45
4) Milieux de culture pour Arthrobacter 50

1e PARTIE - ETUDE DE QUELQUES ECOSYSTEMES AQUATIQUES ET COMPARAISON DE DEUX BIOTOPES. 52

Chapitre I - LES VASES DE QUELQUES ECOSYSTEMES AQUATIQUES 52

A - CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES 52

B - LES GRANDS CYCLES BIOLOGIQUES DANS LES VASES 54

1) Carbone 54

2) Azote 56

3) Soufre 59

C - DISCUSSION DES RESULTATS..... 64

1) Enrichissement des milieux ; répartition spéciale pour l'anaérobiose 64

2) Comparaison des différentes vases 65

D - CONCLUSION : Tentative de mise en évidence des caractères communs 66

Chapitre II - ETUDE COMPARATIVE DE DEUX BIOTOPES : Etangs de la Rouillie et de Soustons 69

A - EXAMEN CRITIQUE DES DONNEES BRUTES 69

1) Etang de la Rouillie 70

2) Etang de Soustons 78

B - ANALYSE MATHEMATIQUE DE CES DONNEES 83

1) Principes des méthodes utilisées 88

a) Analyse en composante principale 88

b) Factorielle des correspondances 89

2) Présentation des résultats 89

3) Liens entre les facteurs extrinsèques et la biologie du milieu 91

a) Vase de l'étang de La Rouillie 91

b) Eau de l'étang de La Rouillie 94

c) Vase de l'étang de Soustons 99

d) Eau de l'étang de Soustons 102

C - CONCLUSION : Problèmes posés par l'azote 108

IIe PARTIE - DYNAMIQUE DE CERTAINS CHAINONS DU CYCLE DE L'AZOTE 110

Chapitre I - ETUDE EXPERIMENTALE DU DEVENIR DE L'AZOTE NITRIQUE DANS L'EAU 112

A - PROTOCOLE DES ESSAIS 112

B - ESSAIS EN BACS 113

1) Evolution des nitrates 115

2) Dénombrement des germes dénitrifiants 115

3) Réorganisation de l'azote minéral 119

4) Echanges entre la vase et l'eau 119

C - EXPERIENCES "IN VITRO" 122

D - ETANG 122

1) Les données chimiques et microbiologiques 122

2) Le potentiel "Redox" 127

E - SYNTHESE DES RESULTATS 127

Chapitre II - DECOMPOSITION DE LA MATIERE ORGANIQUE DANS LA VASE.. 130

A - ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES 131

1) L'eau 131

2) La vase 137

B - LES BILANS D'AZOTE 137

1) Poudre de luzerne 139

2) Poudre de feuilles de chêne 139

3) Témoin 140

C - ETUDES MICROBIOLOGIQUES 141

1) Dénombrement des germes 141

2) Courbes d'activité 143

D - DISCUSSION DES RESULTATS 146

E - CONCLUSION 148

Chapitre III - NITRIFICATION AUTOTROPHE ET HETEROTROPHE DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES 150

A - OBSERVATIONS "IN SITU" 150

B - ETUDES SUR MODELE 155

1) Comparaison Aérobiose-Anaérobiose 155

2) Influence de la matière organique sur la nitrification - Méthode des passages 156

C - NITRIFICATION PAR LES ARTHROBACTER 160

1) Propriétés nitrifiantes 160

2) Ensemencement de vase stérilisée 160

3) Influence de la température 164

D - DISCUSSION DES RESULTATS 164

E - CONCLUSION 168

Chapitre IV - ETUDE DES GAZ DEGAGES PAR LA VASE 171

A - MELANGE GAZEUX PRELEVE "IN SITU" 172

1) Gaz carbonique et méthane 172

2) Azote - Rapport azote/argon 173

B - ETUDE AU LABORATOIRE 173

1) Composition des mélanges gazeux 175

2) Evolution des teneurs en CO_2, CH_4 et H_2 dans les mélanges gazeux 177

3) Azote gazeux - Rapport azote/argon 182

C - DISCUSSION 183

D - CONCLUSION 185

CONCLUSIONS GENERALES 187

BIBLIOGRAPHIE 192